

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Desarrollo de un inhibidor de unión fuerte de
la síntesis de sideróforos en
Yersinia pestis y *Mycobacterium tuberculosis*

JULIAN ALBERTO FERRERAS
NOVIEMBRE DE 2006

MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
JULIAN ALBERTO FERRERAS

para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:

Dr. LUIS QUADRI

Dr. JUAN AYALA SERRANO

Madrid, Noviembre de 2006

A Analía

A mis Padres

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchísimas personas que a lo largo de todos estos años formaron parte de mi vida y que me apoyaron ya sea desde lo científico o lo emocional. Por todo ello, quisiera agradecer en forma especial a las siguientes personas:

En primer lugar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Juan Ayala y el Dr. Luis Quadri, por darme la oportunidad, el espacio, el tiempo, el conocimiento y sobre todo la paciencia durante todo el desarrollo del doctorado.

Al Dr. Derek Tan y a su grupo, por su colaboración en la síntesis del inhibidor que se describe en este trabajo y su modelado molecular.

Al Dr. Cliff Soll por su ayuda con el análisis de espectrometría de masas y la invaluable aporte a la discusión de los resultados.

Al Dr. Jorge Ghiso y familia, por su invalorable apoyo, sus palabras de aliento y por su amistad.

Al Dr. Gabriel Gutkind, por que cuando muchas puertas se cerraban, su ayuda desinteresada fue fundamental en una etapa especial de mi vida.

A todos los amigos de aquí, de allá, de todos lados. Especialmente a todos los del C103 de biológicas, que siempre estuvieron allí con sus consejos, su aguante y a su ánimo y a todos los del piso W712 en Cornell, por la amistad, comprensión, ayuda y clases gratis de inglés.

A mis padres, por que es imposible describir todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí. A mis hermanos, cuñados y sobrinos, por todo el cariño y el aliento constante.

En un apartado especial, quiero agradecer a Analía. Sin ella, todo esto no hubiera sido posible. Su amor y su apoyo incondicional me han mantenido en pie.

Por último, quiero agradecer a la vida, a los problemas que se me han presentado y a mi propia dificultad para resolverlos, que me han permitido conocer gente tan maravillosa en el camino.

ABREVIATURAS

A:	Dominio de adenilación en NRPSs
aa:	Aminoácido
AC:	Antes de Cristo
ACP:	Proteína transportadora de acilos
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AMP:	Adenosin monofosfato
<i>Amp^r</i> :	Resistente a ampicilina
AMS:	Sulfamoiil adenosina
ArCP:	Proteína transportadora de arilos
ARN _t :	Ácido ribonucleico de transferencia
AT:	Acil transferasa
ATP:	Adenosin 5' trifosfato
[³² P] ATP:	Adenosin 5' trifosfato marcado con fósforo radioactivo
BME:	2-mercaptoetanol
C:	Dominio de condensación en NRPSs
C-terminal:	Región carboxilo terminal
<i>Clo^r</i> :	Resistente a cloranfenicol
CoA:	Coenzima A
CP:	Proteína transportadora
DCCA:	Medio de cultivo
DIMs:	Ésteres de dimicoserosatos
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilendiamina tetraacético
g/l:	Gramos por litro
GAST-D:	Medio de cultivo desferrado
HEPES:	Acido N-(2-hidroxietil)primeracina-N'-(2etanosulfónico)
HH:	Hemocromatosis Hereditaria

IC_{50}	Concentración a la cual se obtiene un 50 % de inhibición
IGEPAL:	Nonidet P 40
IPTG:	Isopropil B-D-tiogalactopiranosido
Kan^r :	Resistente a kanamicina
Kda:	Kilodalton
K_i :	Constante de inhibición
K_i^{ap} :	Constante de inhibición aparente
KS:	Ceto sintasa
LB:	Medio de cultivo Luria-Bertani
M:	Molar
MBP:	Proteína de unión a maltosa
mCi:	Milicurie
MES:	Ácido 4-Morfolinetanolsulfónico
ml:	Mililitro
μ l:	Microlitro
mM:	Milimolar
μ F:	Microfaraday
μ M:	Micromolar
N-terminal:	Región amino terminal
nM:	Nanomolar
NRPS:	Sintetasa de péptidos no ribosomal
OD:	Densidad óptica
PAE:	Enzima de arilación de péptidos
PBS:	Tampón de fosfato salino
PCP:	Proteína transportadora de péptidos
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PKS:	Sintasa de policetonas
PMH-D:	Medio de cultivo
PMSF:	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PPi:	Pirofosfato inorgánico

[³² P]PPi:	Pirofosfato marcado con fósforo radioactivo
PPTasas:	Fosfopantoteínil transferasas
4'PP:	4'-fosfopantoteína
p/v:	Peso/volumen
R _f :	Factor de retención
rpm:	Revoluciones por minuto
[³ H]-SAL:	ácido salicílico marcado con tritio radioactivo
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SPA:	Ensayo de centelleo por proximidad
TAE:	Tampón Tris-acetato-EDTA
TB:	Tuberculosis
TBI:	Inhibidor de unión fuerte
TCEP:	Tris(2-carboxietil) fosfin clorhídrico
TE:	Tioesterasa
TF:	Transferrina
TLC:	Cromatografía en capa delgada
Tris-HCl:	Trishidroximetilaminometano-ácido clorhídrico
VIH:	Virus de inmunodeficiencia humana

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Introducción.....	4
1.2 Tuberculosis	4
1.2.1 Generalidades	4
1.2.2 Etiología.....	5
1.2.3 Patogénesis	6
1.3 Peste.....	8
1.3.1 Generalidades	8
1.3.2 Etiología.....	9
1.3.3 Patogenia	10
1.4 El hierro y los sistemas biológicos	10
1.4.1 El hierro y las infecciones	12
1.4.2 Mecanismos de adquisición de hierro por parte de las bacterias.....	13
1.5 Sideróforos	14
1.5.1 Organización de las NRPSs y PKSs	16
1.5.2 Enzimas de arilación de sideróforos	18
1.6 Adquisición de hierro por <i>M. tuberculosis</i>	20
1.6.1 Sideróforos en micobacterias.....	20
1.6.2 Genética	22
1.7 Adquisición de hierro por <i>Y. pestis</i>	22
1.7.1 Sideróforos	24
1.7.2 Genética	24
1.7.3 Estructura y biosíntesis de yersiniabactina.....	25
1.8 Búsqueda de nuevos antimicrobianos	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Cepas bacterianas, crecimiento y conservación	32
3.2 Transformación bacteriana	33

3.3 Manipulación del ADN	34
3.4 Manipulación de proteínas	34
3.5 Construcción de los plásmidos de expresión.....	35
3.5.1 Construcciones de plásmidos y proteínas purificadas en trabajos anteriores..	36
3.5.2 Clonado de <i>ybtE</i> y <i>mbtA</i>	36
3.6 Purificación de proteínas	37
3.7 Síntesis del inhibidor	39
3.8 Ensayo de adenilación y análisis de datos	39
3.9 Ensayo de salicilación	40
3.10 Ensayo de producción de sideróforos	41
3.11 Ensayo de inhibición de crecimiento.....	46
4. RESULTADOS	48
4.1 Diseño y síntesis de salicil-AMS y AMS	49
4.2 Expresión y purificación de proteínas	52
4.3 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	54
4.3.1 Ensayo de adenilación por intercambio [³² P]PPi/ATP	55
4.3.2 Ensayo de salicilación en placas multipocillos	66
4.3.2.1 Optimización de las condiciones de reacción de salicilación en placas multipocillos	68
4.3.2.2 Ensayos de inhibición de la salicilación en placas multipocillos	81
4.4 Inhibición de la síntesis de sideróforos en cultivos bacterianos	82
4.5 Inhibición del crecimiento por salicil-AMS	88
5. DISCUSIÓN	92
5.1 Elección del blanco.....	93
5.2 Diseño del inhibidor	96
5.3 Caracterización del inhibidor en ensayos <i>in vitro</i>	97
5.4 Inhibición de la síntesis de sideróforos	102
5.5 Inhibición del crecimiento	103
6. CONCLUSIONES.....	105

7. REFERENCIAS	108
8. ANEXO	119
8.1 Trabajos publicados.....	120

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1.1:	Incidencia de tuberculosis en el mundo	7
Figura 1.2:	Distribución mundial de la peste en 2004	9
Figura 1.3:	Estructura de algunos sideróforos	15
Figura 1.4:	Representación esquemática del mecanismo de acción de NRPS y PKS	17
Figura 1.5:	Mecanismo de acción de las enzimas de arilación de péptidos	18
Figura 3.1:	Detalle de la construcción en el plásmido pSMT3.....	37
Figura 4.1	Reacción de salicilación del dominio ArCP en dos pasos y estructura de los intermediarios aroil-adenilatos y compuestos relacionados	50
Figura 4.2:	Análisis estructural del sustrato activado a las enzimas de adenilación	51
Figura 4.3:	Proteínas usadas en este trabajo	54
Figura 4.4	Diagrama del ensayo de intercambio de PPi.....	56
Figura 4.5:	Reacción de adenilación por YbtE en función del tiempo.....	57
Figura 4.6:	Cálculo de K_m para los sustratos ATP y ácido salicílico en la reacción de adenilación por YbtE	58
Figura 4.7:	Inhibición de la reacción de adenilación de las enzimas YbtE, MbtA y PchD por salicil-AMS	59
Figura 4.8:	Inhibición de adenilación a diferentes concentraciones de enzima.	61
Figura 4.9:	Inhibición de la adenilación a diferentes concentraciones de ATP	64
Figura 4.10:	Inhibición de la adenilación a diferentes concentraciones de ácido salicílico.....	66
Figura 4.11:	Esquema del ensayo de salicilación de placas multipocillos FlashPlate. ..	67
Figura 4.12:	Ensayo de competición de unión al pocillo de las placas multipocillos	70
Figura 4.13:	Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate a diferentes	

concentraciones de enzima (YbtE).....	71
Figura 4.14: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para comparar los tampones Tris-Cl pH 7,5 y PBS pH 7,4.....	72
Figura 4.15: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar pH y concentración de cloruro de sodio	73
Figura 4.16: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para la optimización del pH	73
Figura 4.17: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de glicerol.....	74
Figura 4.18: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de cloruro de magnesio	75
Figura 4.19: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de ATP	76
Figura 4.20: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de ATP	77
Figura 4.21: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de DMSO	77
Figura 4.22: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de enzima.....	78
Figura 4.23: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar el cargado de la placa FlashPlate con holo- <i>ypArCP-H6</i>	79
Figura 4.24: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para la optimización de TCEP.....	80
Figura 4.25: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate optimizada a diferentes tiempos.....	81
Figura 4.26: Inhibición de la salicilación a diferentes concentraciones de enzima.....	82
Figura 4.27: Inhibición de la síntesis de micobactinas	84

Figura 4.28: Inhibición de la síntesis de yersiniabactina.....	85
Figura 4.29: Radio-TLC mostrando la síntesis de pioquelina en cultivos de <i>P. aeruginosa</i>	86
Figura 4.30: Ensayo de inhibición de pioquelina por salicil-AMS	87
Figura 4.31: Crecimiento de <i>Y. pestis</i> en placas multipocillo en medio PMH-D.....	89
Figura 4.32: Crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> en placas multipocillo en medio GAST-D	90
Figura 4.33: Inhibición del crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> y <i>Y. pestis</i>	91

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Cepas utilizadas.....	32
Tabla 2: Agar rojo congo.....	33
Tabla 3: Plásmidos utilizados	35
Tabla 4: Medio PMH-D.....	42
Tabla 5: Medio GAST-D.....	43
Tabla 6: Medio DCAA	43

ABSTRACT

The causative agents of tuberculosis and plague, *M. tuberculosis* and *Y. pestis* respectively, represent a serious problem for global public health.

Although tuberculosis is curable, 2 millions people die because of this disease every year. It is estimated that one third of the world's population is infected with *M. tuberculosis* and approximately 9 million people per year become sick with active tuberculosis.

In contrast to tuberculosis, plague has a low incidence with approximately 2000 to 3000 cases are reported every year globally. However, the appearance of multiresistant strains, the very high mortality if left untreated, and the deterioration of living conditions in many parts of the world that favor the spread of the disease allow human plague to remain a serious threat to public health. Because *Y. pestis* is very contagious via aerosols, it has the potential to be used as agent for bioterrorism further increasing their threat to global public health.

There is evidence that both microorganisms depend on iron, among other things, to establish a successful infection. As a mechanism of defense, hosts reduce iron availability by binding it to different molecules. To overcome this limitation, bacteria synthesize and release iron-chelating compounds, so-called siderophores, with an extremely high affinity for ferric ions. Thus, siderophore biosynthesis represents a very good target for the development of antibiotics to treat tuberculosis and plague.

In this work we report the design, synthesis and evaluation in both enzyme and cell-based assays, of an inhibitor of the first step of the biosynthesis of the siderophores of *M. tuberculosis* and *Y. pestis*. We show that this inhibitor behaves as a tight binding inhibitor of the enzymes responsible for the adenylation of salicylic acid, and that it inhibits the synthesis of siderophores and consequently the growth of *M. tuberculosis* and *Y. pestis* under iron-limiting conditions. To our knowledge, this compound is the first biochemically confirmed inhibitor of siderophore biosynthesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Las enfermedades infecciosas representan la mayor causa de muerte en el mundo, significando el 33% del total de los aproximadamente 52 millones de muertes que suceden cada año (WHO, 1996). Entre ellas, la tuberculosis posiblemente sea la enfermedad con mayor impacto en la actualidad. Al menos un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* del cual, unos 10 millones de personas desarrollan la enfermedad cada año y unos 2 millones mueren en el mismo período por esta causa (WHO, 2005). Esta realidad, llevó a la Organización Mundial de la Salud a declarar la tuberculosis como una emergencia global en 1993 (WHO, 1993).

Por otro lado, una de las de las enfermedades infecciosas más devastadoras de la historia de la humanidad ha sido la peste (Perry and Fetherston, 1997). Aunque en la actualidad esta enfermedad posee una baja incidencia (alrededor de 2000 casos anuales en todo el mundo (WHO, 2004)), la aparición de nuevos focos en los últimos años la ubican como una enfermedad reemergente (Duplantier, Duchemin et al., 2005). Además, la bacteria que la produce, *Yersinia pestis*, está catalogada por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos en la categoría A, en la que se encuentran aquellos agentes biológicos con el más alto riesgo de ser usados en bioterrorismo (CDC).

Si bien existe tratamiento antibiótico para ambas enfermedades, la abrumadora cantidad de personas afectadas o factibles de ser afectadas por estas dos enfermedades, el largo tratamiento que por ejemplo se debe aplicar en el caso de padecer tuberculosis y la propagación de organismos multiresistentes, hacen imperiosa la búsqueda tanto de nuevos blancos de acción de antibióticos como el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento.

1.2 Tuberculosis

1.2.1 Generalidades

Probablemente, la tuberculosis ha sido la responsable de más muertes que ninguna otra enfermedad en la historia y aunque en la actualidad la mayor incidencia se da en países subdesarrollados o en grupos socialmente excluidos, (Story, van Hest et al., 2006),

ha afectado por igual a todas las clases sociales (Ryan and Ray, 2003).

Se cree que la tuberculosis estaba presente desde tiempos prehistóricos. Posiblemente se haya originado en África y haya acompañado al hombre a lo largo de las migraciones que colonizaron el planeta (Daniel, 2004). Se han encontrado evidencias de la enfermedad en restos humanos hallados en Egipto de al menos 3000 años AC (Zink, Grabner et al., 2005). Entre el siglo XVI y XVII, con el crecimiento de grandes centros urbanos, Europa fue el epicentro de varias epidemias, alcanzando su pico en la primera mitad del siglo XIX, donde se calcula que una cuarta parte de la población europea falleció a causa de la tuberculosis. Las mejoras en las condiciones sanitarias y de habitabilidad provocaron un descenso en la mortalidad por tuberculosis hacia el final de ese mismo siglo. Más tarde, el uso de la vacuna BCG y los tratamientos antibióticos, hicieron que la mortalidad continúe su descenso, sobre todo en el mundo desarrollado. En los últimos 25 años, el incremento de la pobreza y la aparición del SIDA, han hecho que la enfermedad resurgiera, principalmente en países en desarrollo.

Aunque la tuberculosis es una pandemia mundial, su distribución no es homogénea (Figura 1.1A), habiendo factores geográficos y sociales que inciden en el riesgo de infección por *M. tuberculosis*. Se calcula que un tercio de la población mundial está infectado con *M. tuberculosis*, lo que provoca unos 2 millones de muertes y unos 9 millones de nuevos casos anuales (WHO, 2004), dándose la mayoría de las muertes (98%) en países en desarrollo (Cole, Eisenach et al., 2005). Existe una fuerte relación entre la tuberculosis y el VIH (Figura 1.1B) (WHO, 2005), Estar infectado con este virus incrementa enormemente la posibilidad de desarrollar tuberculosis, siendo una de las principales causas de muerte de los enfermos de SIDA (Reid, Scano et al., 2006).

1.2.2 Etiología

En 1882, Robert Koch determinó la naturaleza bacteriana de la tuberculosis y aisló el bacilo responsable de la infección, *Mycobacterium tuberculosis*. Junto con *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* forma un grupo de bacterias conocido como complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Cole, Eisenach et al., 2005), con los cuales está

altamente relacionado.

M. tuberculosis pertenece a la familia Mycobacteriaceae y al orden Actinomycetales. Son bacilos aerobios estrictos que no esporulan, inmóviles y con un tiempo de generación de aproximadamente 24 horas, requiriéndose entre 3 y 8 semanas para formar colonias identificables. Como presenta una tinción de Gram irregular, se lo identifica con la tinción de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido alcohol resistentes (Ryan and Ray, 2003). Esta propiedad se debe a la presencia de una compleja envoltura celular donde se destacan la presencia de ácidos grasos de gran longitud de cadena (C₆₀-C₉₀) denominados ácidos micólicos, y una serie de glucolípidos y fenol-glucolípidos, importantes en la respuesta inmune y en virulencia como el factor de crecimiento en cuerda (Ryll, Kumazawa et al., 2001; Ryll, Watanabe et al., 2001) o los ésteres de DIMs (Onwueme, Vos et al., 2005).

1.2.3 Patogénesis

Si bien la tuberculosis pulmonar es la más frecuente, la infección se puede presentar en otras localizaciones como en el caso de tuberculosis espinal o enfermedad de Pott (Huelskamp, Anderson et al., 2000), adenopatía tuberculosa o escrófula (Bayazit, Bayazit et al., 2004), o puede afectar al sistema nervioso central (Katti, 2004) el sistema digestivo (Sharma and Bhatia, 2004), el tracto urinario (Wise and Marella, 2003) o la piel (Kivanc-Altunay, Baysal et al., 2003).

La transmisión de *M. tuberculosis* ocurre por la inhalación de microgotas presentes en el aire y que transportan el bacilo. Antes de que se adoptara el proceso de pasteurización de la leche, era común adquirir la bacteria por el tracto gastrointestinal al consumir leche de vacas tuberculosas (Ryan and Ray, 2003). Una vez inhalado, éste pasa directamente a los alvéolos pulmonares y establece la infección con un período de incubación que puede durar 3 semanas o permanecer latente toda la vida. Allí, *M. tuberculosis* es fagocitado por macrófagos activados no específicamente que, si no son capaces de matar a la bacteria ingerida, permite que ésta se multiplique. De esta manera, *M. tuberculosis* replica libremente dentro de la célula, drenando luego a los nodos linfáticos y diseminándose en forma hematógena a otras localizaciones como el ápice de los pulmones, los huesos, o los

riñones. En esta etapa se desarrolla la respuesta inmune que frena el crecimiento bacteriano y que en el sitio de la infección primaria puede provocar la eliminación completa del microorganismo, pero solo una parada del crecimiento en los sitios a los cuales se diseminó en forma secundaria. Después de un período que puede durar meses o años, el crecimiento de *M. tuberculosis* puede reactivarse produciendo la enfermedad. Al comienzo, se forman pequeños focos con necrosis caseosas en el centro que en el caso de erosionar hacia un bronquio, vacía su contenido en él, dejando una cavidad en el lugar de la lesión. Ya en los bronquios, *M. tuberculosis* puede multiplicarse mejor y ser liberado a la atmósfera a través del aire expirado (tos), produciéndose una nueva infección si un hospedador sensible lo inhala (Ryan and Ray, 2003).

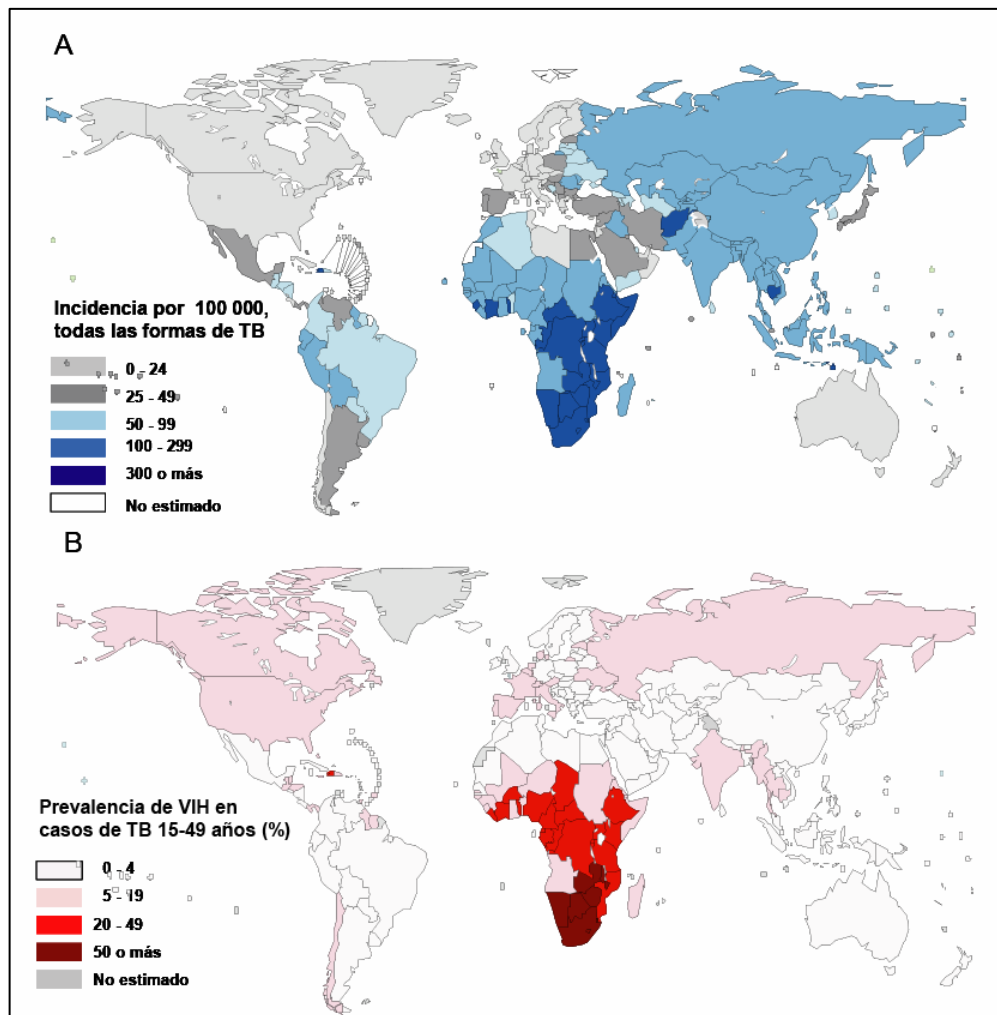


Figura 1.1: Incidencia de tuberculosis en el mundo. (A) Incidencia estimada de tuberculosis en 2003. (B) Prevalencia de VIH en caso de tuberculosis. TB: tuberculosis. Gráficos extraídos y adaptados de WHO report 2005 (WHO/HTM/TB/2005.349) (WHO, 2005).

1.3 Peste

1.3.1 Generalidades

La peste es una enfermedad zoonótica, que afecta en forma primaria a los roedores y que puede ser transmitida incidentalmente a los humanos o a otros mamíferos, principalmente a través de la picadura de las pulgas de las ratas infectadas, y que sin tratamiento alcanza altas tasas de mortalidad (Ryan and Ray, 2003).

La historia registra grandes epidemias que se propagaron rápidamente y que diezmaron trágicamente poblaciones enteras, provocando, como tal vez ninguna otra enfermedad, profundos cambios políticos, sociales y demográficos (Scott and Duncan, 2001). Los primeros registros de la peste se remontan al siglo VI y se la conoce como “La gran peste de Justiniano”, que se extendió por Egipto, Siria, el norte de África y gran parte de Europa y que se calcula que provocó la muerte de cerca de la mitad del imperio bizantino (Perry and Fetherston, 1997).

En el siglo XIV la peste reaparece en Europa entrando a través de los puertos italianos desde China. Rápidamente se extiende por todo el continente entre los años 1347 y 1351, muriendo un porcentaje estimado de entre el 30 y el 40 % de la población (Gorbach, Bartlett et al., 2004). Para mediados del siglo XIX, la peste prácticamente desapareció de Europa, pero a finales del mismo siglo una nueva pandemia se originó en China y llegó a todos los continentes. Se calcula que en India unos 12,5 millones de personas murieron por la enfermedad en este período (Perry and Fetherston, 1997). Más recientemente, dos focos epidémicos durante el verano de 1994 en India (Shivaji, Bhanu et al., 2000; Clem and Galwankar, 2005), que en un principio generó controversia sobre si realmente fue peste (Deodhar, Yemul et al., 1998), provocó la alarma y el aislamiento internacional del país (Ramalingaswami, 2001).

En la actualidad, la peste es una zoonosis ampliamente distribuida con reservorios en todos los continentes excepto Australia (Dennis, Gage et al., 1999) (Figura 1.2) y aunque se registran solo unos 2000 casos anuales, las epidemias de peste ocurridas desde la última década (1997; Das, 2003; 2004; Lounici, Lazri et al., 2005; 2006) y el uso potencial de la bacteria como arma biológica (CDC; Inglesby, Dennis et al., 2000;

Greenfield, Drevets et al., 2002; Greenfield and Bronze, 2003) le han dado gran relevancia en la actualidad.

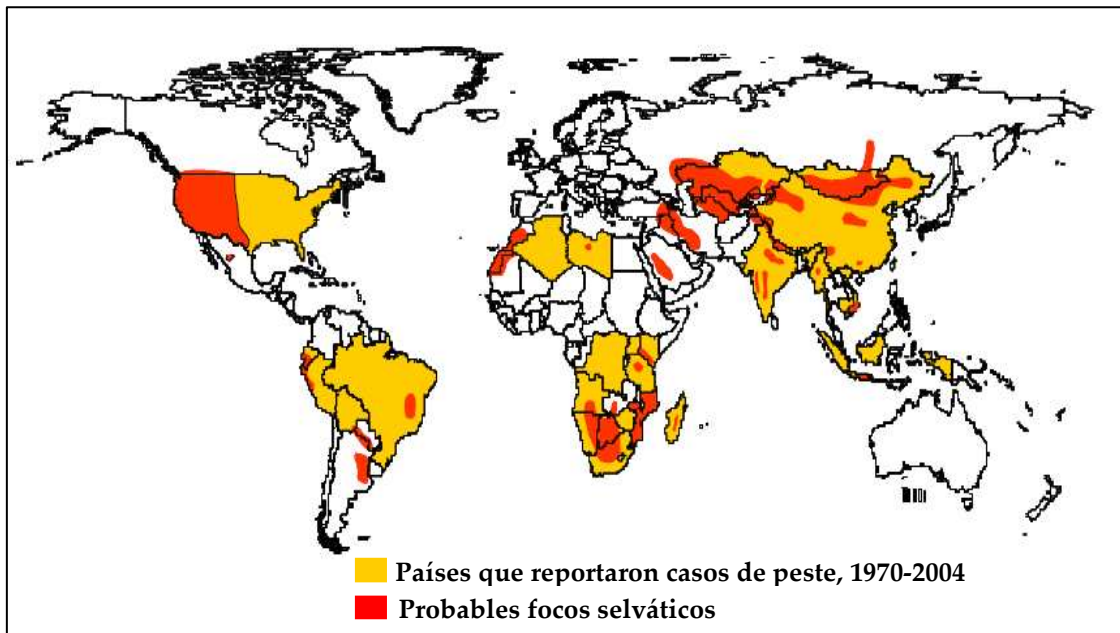


Figura 1.2: Distribución mundial de la peste en 2004. Extraído y adaptado de (Department of Human Health and Services, 2005)

1.3.2 Etiología

Alexander Yersin aisló y describió por primera vez el organismo causante de la peste, *Yersinia pestis*, durante un brote epidémico en Hong Kong en 1894 (Bibel and Chen, 1976). Desde su descubrimiento, este organismo fue conocido con otros nombres como *Bacterium pestis*, *Bacillus pestis* y *Pasteurella pestis* (Perry and Fetherston, 1997).

Y. pestis pertenece a la familia Enterobacteriaceae que junto con *Yersinia paratuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*, son las 3 especies del género *Yersinia* que son patógenos para el ser humano. Es un cocobacilo gram-negativo, inmóvil y anaerobio facultativo. Puede crecer en un rango de temperatura desde los 4°C a los 40°C, con una temperatura óptima de 28-30°C (Gorbach, Bartlett et al., 2004).

La mayoría de las cepas de *Y. pestis* poseen 3 plásmidos (pPCP1, pCD1 y pMT1) que entre otras cosas codifican para bacteriocinas como la pesticina (en el plásmido pPCP1), determinantes de virulencia como el estimulón de respuesta a bajo calcio (en el plásmido

pCD1) y la toxina murina (en el plásmido pMT1) (Perry and Fetherston, 1997).

1.3.3 Patogenia

Los seres humanos adquieren la infección por *Y. pestis* principalmente por picaduras de pulgas infectadas con la bacteria, pero también por contacto directo con sangre o tejido de animales infectados, o vía aerosol de personas o mascotas con peste neumónica.

Dependiendo de la ruta de infección, existen 3 formas de peste. La bubónica es la más común y se adquiere a partir de la picadura de pulgas de ratas infectadas o de algún otro mecanismo de introducción cutánea. Una vez que la bacteria atraviesa la piel, viaja por el sistema linfático hasta el nódulo, donde es capaz de multiplicarse en números muy altos, produciendo su hinchazón (bubo). La infección puede quedar restringida allí o alcanzar la corriente sanguínea provocando una peste septicémica secundaria. Pero esta forma de peste también puede ocurrir en forma primaria sin que aparentemente se involucren los nódulos linfáticos. El tercer tipo de peste, la neumónica, es una infección pulmonar y representa el mayor peligro para la salud pública, ya que es altamente contagiosa de persona a persona. Puede presentarse como una infección primaria por inhalación de la bacteria presente en microgotas en el aire o, en forma secundaria, a partir de una peste septicémica. Los tiempos de incubación de la enfermedad varían dependiendo del tipo. En la peste bubónica este tiempo es de entre 2 y 7 días, mientras que la neumónica es de entre 2 a 3 (Ryan and Ray, 2003).

1.4 El hierro y los sistemas biológicos

El hierro es el segundo metal más abundante sobre la tierra y es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos. Puede adoptar cualquiera de las dos formas iónicas cargadas positivamente, Fe^{2+} y Fe^{3+} , cuyos potenciales redox varían enormemente dependiendo de la molécula a la que se encuentre unido. Estas moléculas cumplen diversas funciones en los sistemas biológicos, desde servir como fuentes de almacenamiento de hierro, funcionar como transportadores de oxígeno o formar parte de enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción,

participando en funciones celulares esenciales como transporte de electrones, síntesis de ADN, aminoácidos, etc. (Griffiths, 1999; Wandersman and Delepelaire, 2004).

Pero a pesar de su abundancia, el hierro no está biológicamente disponible en forma directa. En la naturaleza, en presencia de oxígeno, éste es oxidado al ion férrico (Fe^{3+}) formando polímeros insolubles de oxi-hidróxidos. Al igual que en la naturaleza, en los fluidos corporales de los mamíferos y a un pH fisiológico, el hierro que se encuentra libre en su forma ferrosa (Fe^{2+}) más soluble, es fácilmente oxidado a hidróxido férrico, el cual, debido a su baja solubilidad (10^{-36} M), precipita en complejos insolubles (Griffiths, 1999).

Las particularidades del hierro le permiten sufrir cambios en su estado de oxidación que hacen posible su participación en varios procesos de oxido-reducción. Esta misma característica, que le permite ser un importante agente catalítico, se puede convertir en su principal problema. Por ejemplo, cuando este es reducido, actúa en la reacción de Fenton generando radicales hidroxilos (Griffiths, 1999):



Estos radicales son los más nocivos y debido a su alta reactividad, una vez generados, reaccionarán rápidamente con la mayoría de las macromoléculas orgánicas presentes en las células, como membranas celulares y el ADN (Imlay and Linn, 1988).

Para prevenir estos efectos negativos y debido a su baja solubilidad, prácticamente todo el hierro que circula en los vertebrados superiores, incluidos los seres humanos, permanece unido a diferentes proteínas. La mayor parte se encuentra en forma intracelular unido a ferritina o grupos hemo, mientras que el hierro circulante en el plasma o secreciones extracelulares lo hacen unido a transferrinas que, dependiendo de su localización principal, se denominan serotransferrina, lactotransferrina u ovotransferrina, ya sea que se encuentren en el plasma sanguíneo, en secreciones como la leche o en el huevo, respectivamente. Las transferrinas tienen dos sitios de unión para el hierro, los cuales nunca están completamente saturados. Esto permite secuestrar cualquier molécula de hierro extra que se adquiriera en forma repentina, manteniendo siempre baja su

concentración libre (Griffiths, 1999).

1.4.1 El hierro y las infecciones

Debido al rol esencial que el hierro ocupa tanto en el metabolismo de las bacterias como en el del hospedador, el balance en las concentraciones de hierro en este último juega un papel fundamental en los procesos infecciosos (Schaible and Kaufmann, 2004). De hecho, un importante mecanismo de defensa de los mamíferos frente a las infecciones, es reducir el acceso al hierro por parte de las bacterias, ya sea regulando la concentración de hierro disponible por debajo de las concentraciones requeridas por el patógeno o limitando la capacidad de éstos para adquirirlo (Kontoghiorghes and Weinberg, 1995; Holmes, Paulsene et al., 2005).

Varios estudios epidemiológicos sugieren la importancia del hierro en el desarrollo de la infección. Se ha llegado a especular que la hemocromatosis hereditaria (HH), una condición de exceso de hierro heredada mayormente en los descendientes de caucásicos europeos, puede haber sido seleccionada positivamente a partir de las epidemias de peste por *Y. pestis* que azotaron Europa en el pasado (Moalem, Percy et al., 2002). La HH es un desorden genético asociado a una progresiva acumulación de hierro en una gran variedad de órganos pero con un nivel disminuido de hierro en macrófagos y un aumento en la velocidad de eliminación de hierro del lumen intestinal. Esto llevó a la proposición de que la HH fue una forma de protección temprana frente a la peste antes de que comience la acumulación de hierro en los tejidos (Moalem, Percy et al., 2002). En otros estudios sobre estas mismas epidemias, se atribuyen las diferencias en las tasas de mortalidad entre distintos grupos poblacionales, entre otras cosas, al estatus del hierro en cada uno de ellos (Ell, 1984; Ell, 1985).

En cuanto a la tuberculosis, ya en 1873 se relacionaba la administración de hierro con la reactivación de la enfermedad (Trousseau, 1872). Estudios epidemiológicos más recientes muestran que en ciertas regiones de África, donde la sobrecarga de hierro por consumo excesivo en la dieta es un importante problema de salud, existe un riesgo incrementado de infecciones, sobre todo de tuberculosis, la cual es muy prevalente en la región (Gordeuk, McLaren et al., 1996; Moyo, Gangaidzo et al., 1997; Kasvosve,

Gangaidzo et al., 2000).

Varios estudios *in vitro* y en ratones demostraron la influencia de los niveles de hierro en la ocurrencia y el resultado final de la infección por *M. tuberculosis* (Lounis, Truffot-Pernot et al., 2001; Collins, 2003) o de *M. avium* (Dhople, Ibanez et al., 1996). La infección en ratones se incrementa en condiciones de exceso de hierro. Por otro lado el tratamiento con lactoferrina de ratones “knockout” para μ_2 -microglobulina, los cuales muestran sobrecarga de hierro, conduce a un mejoramiento del estado infeccioso (Schaible, Collins et al., 2002). En otro estudio, mutantes de *M. tuberculosis* que carecen de la habilidad para adquirir hierro muestran un crecimiento atenuado en macrófagos (De Voss, Rutter et al., 2000).

1.4.2 Mecanismos de adquisición de hierro por parte de las bacterias

Aunque en la naturaleza, el hierro es el cuarto elemento más abundante, su disponibilidad para los sistemas biológicos está dramáticamente reducida debido a su escasa solubilidad. A un pH fisiológico Fe^{3+} tiene una solubilidad de 10^{-18} M, mientras que las bacterias necesitan una concentración mínima de 10^{-8} M para poder crecer (Stintzi, Barnes et al., 2000).

A pesar de las restricciones al acceso de hierro por parte del hospedador, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para adquirirlo de distintas fuentes. Además de las transferrinas, las bacterias pueden usar el hierro presente en la hemoglobina, a través de la lisis de eritrocitos y la posterior proteólisis de la hemoglobina, o de la ferritina, la cual es el principal sistema de almacenamiento de hierro no solo en animales sino también en plantas.

Básicamente, las bacterias han desarrollado dos mecanismos para adquirir hierro del hospedador. Uno involucra un contacto directo con la fuente de hierro, la remoción del mismo por algún mecanismo reductor y la posterior adquisición. El otro involucra la síntesis de pequeñas moléculas denominadas sideróforos, capaces de secuestrar, debido a su más alta afinidad, el hierro presente en transferrinas y ferritinas.

1.5 Sideróforos

Los sideróforos son pequeñas moléculas peptídicas o híbridos de pequeños péptidos y policetonas, que son producidos por bacterias, hongos y algunas plantas. Su alta afinidad por el Fe^{+3} (k_d : 10^{-22} a 10^{-50} M) (Drechsel and Jung, 1998) puede removerlo de moléculas como transferrinas y ferritinas o de sales férricas insolubles.

La síntesis y el transporte de los sideróforos están regulados. Este proceso es esencial para la bacteria, ya que un fallo en el mismo podría provocar una deficiencia o una sobrecarga a niveles tóxicos de hierro. En general, la regulación se da por la acción de una proteína represora (Fur, IdeR o DtxR) (Rodriguez and Smith, 2003). En presencia de Fe^{2+} , estos represores se unen a operadores específicos en los promotores de los genes que regulan impidiendo su transcripción (de Lorenzo, Wee et al., 1987). Cuando la concentración de hierro intracelular cae por debajo de ciertos límites, el represor no puede unirse al ADN y los genes involucrados en la adquisición y el transporte de hierro son transcritos.

Para coordinar los iones férricos los sideróforos presentan grupos funcionales que pueden ser básicamente tres: a) el átomo de nitrógeno en los anillos tiazolinos, como en el caso de yersiniabactina, pioquelina o anguibactina, u oxaxolinos como en el caso de vibriobactina y micobactina (figura 1.3), b) las cadenas laterales de N-hidroxiaminoácidos presentes por ejemplo en micobactinas y anguibactina (figura 1.3), y c) los grupos hidroxilos adyacentes de los catecoles presentes en los sideróforos enterobactina, anguibactina, y vibriobactina (figura 1.3). Estos catecoles derivan del ácido 2,3-dihidroxibenzoico y en algunos sideróforos, como en micobactina, yersiniabactina y pioquelina hay un grupo fenol en vez de un catecol proveniente del uso de ácido salicílico en vez de ácido 2,3 dihidroxibenzoico como precursor de la síntesis (figura 1.3) (Quadri, 2000).

Al igual que un sinnúmero de productos naturales producidos por muchos microorganismos con una amplia variedad de actividades biológicas, los sideróforos son biosintetizados por grandes complejos macromoleculares que comprenden sistemas multienzimáticos de síntesis peptídica no ribosomal denominados NRPS (del inglés Non

Ribosomal Peptide Synthetase) y, como en el caso de sideróforos mixtos formados por péptidos y policetonas, además de las NRPS, el complejo esta formado por sintetetas de policetonas llamadas PKS (del inglés Polyketide Synthase). Las NRPSs pueden usar una gran variedad de aminoácidos como sustratos incluyendo varios no proteinogénicos (Keating and Walsh, 1999) Por su parte las PKSs utilizan precursores acilados de CoA. La gran variedad de moléculas producidas por estos complejos se debe en gran medida a la gran variedad de sustratos que pueden ser usados (Marahiel, 1997; Marahiel, Stachelhaus et al., 1997)

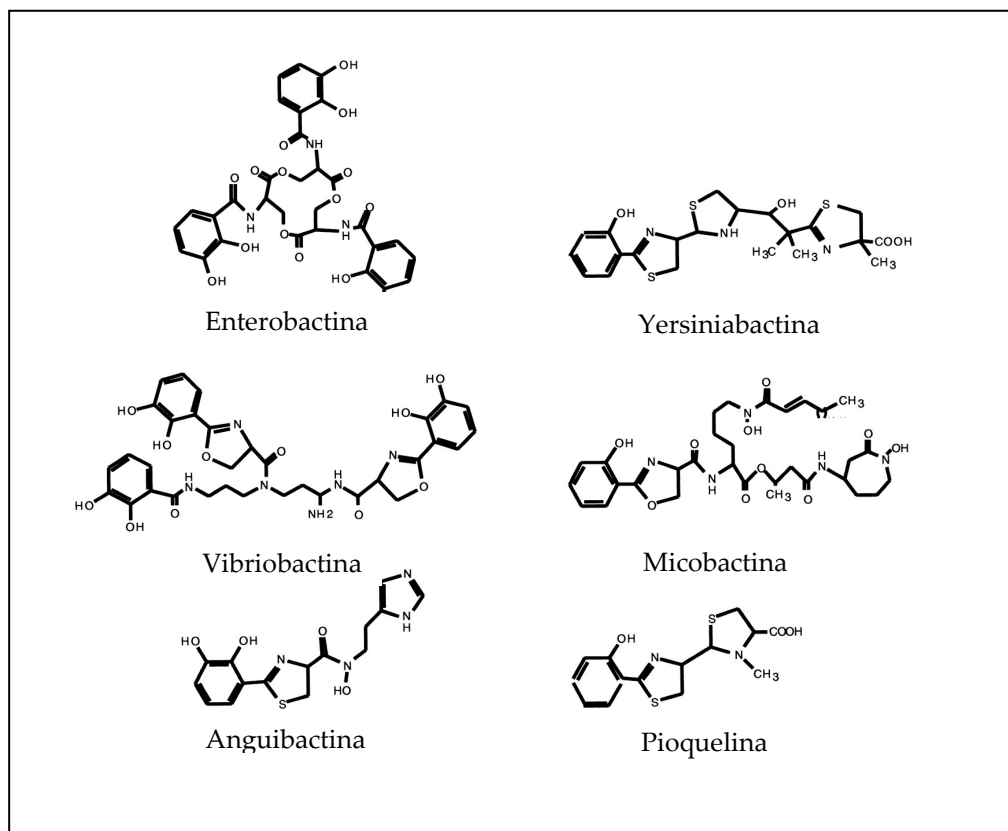


Figura 1.3: Estructura de algunos sideróforos bacterianos como reportadas en (Crosa and Walsh, 2002). Enterobactina (*E. coli*). Vibriobactina (*V. cholerae*). Anguibactina (*V. anguillarum*). Micobactina (*M. tuberculosis*). Yersiniabactina (*Y. pestis*). Pioquelina (*P. aeruginosa*).

1.5.1 Organización de las NRPSs y PKSs

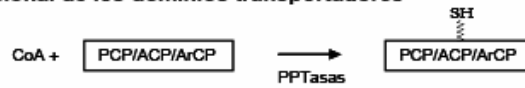
Las NRPSs y PKS muestran una extraordinaria similitud en la organización molecular y en el mecanismo de síntesis a pesar de las enormes diferencias en los sustratos que usan y en el producto final que generan. Tanto las NRPSs como las PKSs están organizadas en módulos que son responsables, cada uno de ellos, de la incorporación de uno de los precursores del producto final. Todos los módulos pueden encontrarse en un solo polipéptido, como en el caso de la NRPS responsable de la biosíntesis de la ciclosporina A, o distribuidos en varias proteínas. Como el módulo define el precursor a ser incorporado, además de la función biosintética, estos módulos se usan como molde para la secuencia de síntesis.

Cada módulo, a su vez, está constituido por unidades enzimáticas o dominios que catalizan las 3 reacciones básicas de síntesis de estos compuestos: a) activación del sustrato en NRPSs, b) su unión covalente al complejo y c) la elongación del intermediario. Además de estas funciones enzimáticas esenciales, otras enzimas son requeridas para modificar y/o decorar el producto final, las cuales cumplen funciones de ciclización, epimerización, oxidación, metiltransferasas o glicosiltransferasas (Figura 1.4).

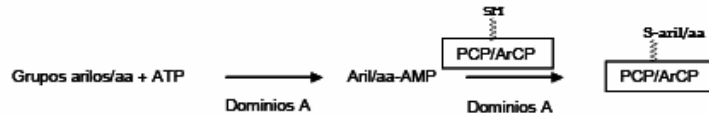
Cada módulo consta de sitios de anclaje donde se agregan los precursores, permaneciendo unidos al complejo. En las NRPSs existen dos tipos de estos dominios: dominios transportadores de péptidos o PCP (por las siglas en inglés de Peptidil Carrier Protein), y dominios transportadores de arilos o ArCP (por las siglas en inglés de Aryl Carrier Protein), mientras que en las PKSs, estos dominios se denominan proteínas transportadoras de acilos o ACP (por las siglas en inglés de Acyl Carrier Protein). Para que sean activos, éstos deben sufrir una modificación en la que un brazo flexible de 4'-fosfopantoteína (4'PP) se agrega en forma post-traducciona al PCP, ArCP o ACP. Esta modificación convierte al dominio inactivo apo-PCP/apo-ArCP/apo-ACP a la forma funcional holo-PCP/holo-ArCP/holo-ACP, siendo catalizado por una familia de enzimas denominadas fosfopantoteinil transferasas (PPTasas) que transfieren el grupo 4'PP de la CoA a una serina conservada del dominio. Cada unidad que formará parte de la molécula

final se une covalentemente al 4'PP por un dominio de adenilación (A) en las NRPSs o una acil transferasa (AT) en la PKSs. Estos monómeros se elongan luego por acción de los dominios de condensación (C) en NRPSs o ceto sintetas (KS) en las PKSs, los cuales catalizan el ataque nucleofílico del precursor unido covalentemente en el dominio PCP-ArCP/ACP ubicado en posición carboxi-terminal al dominio C/KS, sobre el precursor aceptor o electrofílico unido covalentemente al dominio PCP/ACP localizado en posición N-terminal con respecto al dominio C/KS. La especificidad en el monómero que va a ser incorporado está dada principalmente por los dominios C y AT mientras que los dominios de elongación C y KS, determinan la dirección de síntesis.

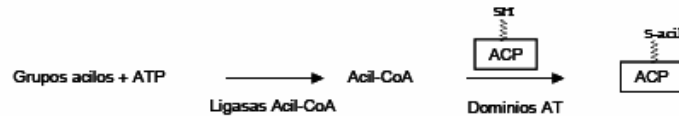
A- Modificación postraduccionnal de los dominios transportadores



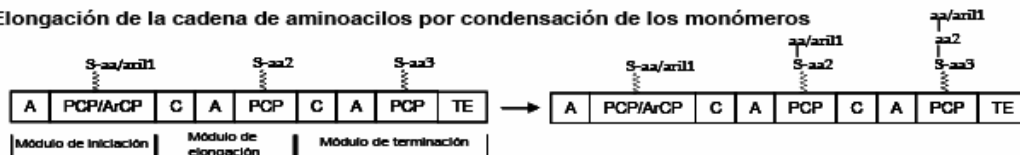
B- Activación y cargado del sustrato (aminoácidos o grupos arilos)



C- Activación y cargado del sustrato (pequeños grupos acilos)



D- Elongación de la cadena de aminoacilos por condensación de los monómeros



E- Elongación de la cadena de acilos por condensación de los monómeros

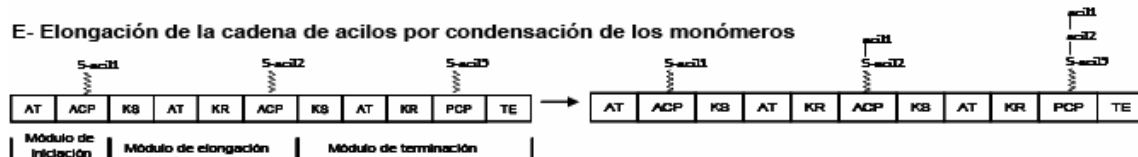


Figura 1.4: Representación esquemática del mecanismo de acción de NRPS y PKS. **(A)** Modificación postraduccionnal por las PPTasas que convierte a los dominios inactivos apo-ACP, apo-ArCP o apo-PCPs en dominios activos holo-ACP, holo-ArCP u holo-PCP. **(B)** Activación (adenilación) de aminoácidos y anillos arilos y cargado de los mismos en los correspondientes dominios PCP or ArCP. **(C)** Activación de pequeños monómeros de ácidos carboxílicos por acil-CoA ligasas y cargado de los mismos en los dominios ACP por dominios AT. **(D)** Formación del producto por NRPS. **(E)** Formación del producto por PKS. Gráfico extraído y adaptado de (Quadri, 2000).

1.5.2 Enzimas de arilación de sideróforos

La síntesis de un grupo de sideróforos (Figura 1.3), comienza por la incorporación en el primer paso de síntesis, de una molécula generalmente de catecol o fenol derivados del ácido dihidroxibenzoico y del ácido salicílico respectivamente, incorporados por enzimas particulares denominadas, en forma genérica, como enzimas de arilación de péptidos o PAE (Quadri, 2000). Estas enzimas son polipéptidos independientes, que no son parte física de ningún módulo y transfieren el monómero activado en *trans* al grupo 4'PP de un dominio transportador de arilos o ArCP (del inglés Aryl Carrier Protein) (Figura 1.5). La incorporación de estos grupos arilos podría ser análogo a la incorporación de N-formil metionina en el comienzo de la síntesis de proteína por los ribosomas en las bacterias, determinando así la dirección de síntesis al provocar que el primer aminoácido incorporado al primer PCP funcione solo como un donante N-acilado al inicio de la síntesis (Crosa and Walsh, 2002).

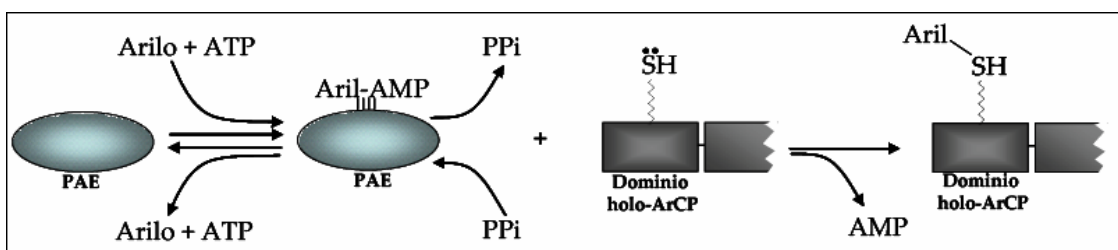


Figura 1.5: Mecanismo de acción de las enzimas de arilación de péptidos (PAE).

Al igual que los demás dominios A, las PAE activan sus sustratos, ácido dihidroxibenzoico o ácido salicílico, como aril-adenilatos respectivamente, en una reacción reversible como se describe en la primera parte de la figura 1.4, donde la unión de los sustratos ácido dihidroxibenzoico o ácido salicílico y ATP, genera el ataque nucleofílico del carboxilato sobre el fosfato γ del ATP generando los intermediarios dihidroxibenzoil-AMP o salicil-AMP, los cuales se mantienen fuertemente unidos a la enzima, liberando en el proceso PPi. Esta reacción permite comprobar su actividad *in vitro* a través del ensayo de intercambio $^{32}\text{PPi}/\text{ATP}$, desarrollado primariamente para la detección de la formación de intermediarios aminoacil-AMP por las sintetisas responsables del cargado de los ARN_t (Lemoine, Waller et al., 1968). En la segunda parte de la reacción la enzima transfiere al acil-adenilato al azufre nucleofílico del grupo 4'PP

del ArCP correspondiente con la liberación de AMP.

Basados en la estructura cristalina del dominio A que activa fenilalanina (PheA) en la NRPS responsable de la síntesis de gramicidina S (GrsS) (Conti, Stachelhaus et al., 1997), se identificaron 10 residuos importantes para el reconocimiento del aminoácido y su catálisis. Esto, sumado a la alta conservación de los residuos del sitio activo entre dominios A que activan diferentes aminoácidos, permitió establecer un código no ribosomal capaz de predecir el sustrato a ser activado (Conti, Stachelhaus et al., 1997; Stachelhaus, Mootz et al., 1999; Challis, Ravel et al., 2000; Eppelmann, Stachelhaus et al., 2002; Rausch, Weber et al., 2005).

La obtención de la estructura cristalina de DhbE (May, Kessler et al., 2002), una enzima de arilación que activa ácido dihidrobenzoico en el primer paso de síntesis de bacililactina en *Bacillus subtilis*, mostró que la enzima presenta dos dominios organizados según el modelo descrito como de martillo y yunque (Conti, Franks et al., 1996). El dominio N-terminal, más grande, comprende los residuos 1 al 420 y el más pequeño, C-terminal, está formado por los residuos 421 al 536. El sitio de unión a los sustratos ácido 2,3-dihidroxibenzoico y ATP se encuentra en un compartimiento sobre la superficie del dominio N-terminal en la interfase con el segundo dominio, y está parcialmente cubierto parcialmente por un bucle formado por los residuos 190 al 199. La estructura presenta tres estados catalíticos al igual que las demás enzimas de adenilación: a) sin sustratos, b) con ácido dihidroxibenzóico y c) con el producto dihidroxibenzoil-AMP. Pero a diferencia de PheA, los módulos no parecen tener el movimiento relativo que se sugiere en esta última, sino más bien cambios estructurales locales durante la formación del producto. Además de otras características particulares, este trabajo permitió comprobar que si bien esta enzima muestra los residuos más conservados que caracterizan la superfamilia, presenta algunas diferencias notables con aquellos motivos conservados en los dominios de adenilación que le confieren especificidad para activar diferentes aminoácidos (May, Kessler et al., 2002), pudiendo diferenciar incluso el “código” que reconoce ácido dihidroxibenzóico.

A diferencia de los dominios de adenilación que activan aminoácidos, las PAEs no se

encuentran en el ser humano, convirtiéndose en excelentes blancos para el desarrollo de nuevas drogas. Además de DhbE que ha sido cristalizada, otras PAEs han sido clonadas y purificadas y su actividad demostrada *in vitro*. EntE activa ácido dihidroxibenzóico en el primer paso de síntesis de enterobactina, un sideróforo aislado primariamente de *Escherichia coli*, pero que también es producido por otros géneros de enterobacterias (Gehring, Bradley et al., 1997). PchD participa en la síntesis de pioquelina, uno de los sideróforos sintetizados por *Pseudomona aeruginosa*, y a diferencia de EntE activa ácido salicílico en vez de ácido dihidroxibenzóico. Su actividad fue reportada por Quadri et al en 1999 cuando el sideróforo se reconstruyó *in vitro* y se propuso el modelo de síntesis (Quadri, Keating et al., 1999). YbtE es producida por *Y. pestis*, y está involucrada en la activación de ácido salicílico para la síntesis del sideróforo yersiniabactina. El clonado y purificación de la proteína, junto con otras enzimas involucradas en la síntesis, permitió la reconstrucción parcial de la síntesis y demostrar su actividad (Gehring, Mori et al., 1998). Por último, MbtA es responsable de la activación y cargado de ácido salicílico en la síntesis de micobactina, un sideróforo producido por micobacterias. La enzima ha sido clonada y caracterizada *in vitro* activando, al igual que YbtE y PchD, ácido salicílico y transfiriéndolo al dominio ArCP que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína MbtB (Quadri, Sello et al., 1998).

1.6 Adquisición de hierro por *M. tuberculosis*

1.6.1 Sideróforos en micobacterias

Micobactinas y exoquelinas son los sideróforos más importantes y complejos descritos en micobacterias. Se ha sugerido que el ácido cítrico y el ácido salicílico podrían tener funciones en la adquisición de hierro, pero su rol en este proceso está en discusión (Messenger and Ratledge, 1982; Chipperfield and Ratledge, 2000).

La síntesis de micobactinas y exoquelinas se induce en presencia de bajas concentraciones de hierro y ambas muestran una muy alta afinidad por el mismo. Las micobactinas se caracterizan por la presencia de un anillo de feniloxazolidina mientras que las exoquelinas son pequeños péptidos con presencia de hidroxamatos derivados de

la ornitina. A diferencia de las micobacterias saprofíticas como *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium neoaurum* que producen ambos sideróforos, las micobacterias patógenas, como *M. tuberculosis*, solo producen micobactinas. Estas últimas se pueden encontrar en dos formas relacionadas. Comparten la misma estructura central, pero varían en la longitud de un grupo alquil que les confiere diferencias notables en la polaridad y solubilidad y, por lo tanto, en su destino final. La menos polar (micobactinas asociadas a membrana) permanece asociada a la membrana, mientras que la más polar y soluble (micobactinas solubles) es secretada al medio extracelular.

Aún no hay acuerdo acerca de la nomenclatura más adecuada para diferenciar ambas micobactinas y esto suele dar lugar a confusión con otros sideróforos de naturaleza química diferente (De Voss, Rutter et al., 1999). Aquí se usará el nombre de micobactinas en forma general y micobactina asociada a membrana y micobactina soluble para referirse en particular a cada una de ellas.

Si bien no está claro porque *M. tuberculosis* requiere dos sideróforos, se ha sugerido que micobactina asociada a membrana podría participar en la internalización y/o en el almacenamiento temporal del hierro, de manera de prevenir un exceso si este aparece repentinamente disponible luego de un período de limitación (Ratledge, Patel et al., 1982; Luo, Fadeev et al., 2005).

Las micobactinas fueron purificadas por primera vez en 1949 a partir de cultivos de *M. phlei* como un factor de crecimiento necesario para el cultivo *in vitro* de *M. paratuberculosis* (Francis, Madinaveitia et al., 1949), pero el nombre de micobactina se usó por primera vez algunos años más tarde cuando, mejorando los sistemas de purificación, sus principales características químicas y su estructura fueron establecidas (Francis, Madinaveitia et al., 1953). Para ese mismo tiempo se aisló la micobactina de *M. tuberculosis*, la cual se la identificó como micobactina T (Snow, 1965) para diferenciarla de la purificada de *M. phlei*, que se denominó desde ese momento como micobactina P (Snow, 1965).

Estos sideróforos presentan una estructura mixta de péptido y policetona, siendo el primer bloque de construcción una molécula de ácido salicílico. Presenta un sistema

bicíclico seguido por un hidroxil-lisina acilada ligada a una hidroxil-lisina ciclizada por una policetona, con una K_d de aproximadamente 10^{-36} M para el complejo Fe^{3+} -sideróforo (Snow, 1970)

1.6.2 Genética

Quadri *et al* identificaron en *M. tuberculosis* el agrupamiento génico *mbt* responsable de la síntesis del núcleo común de micobactina. Abarca 24 kb y comprende 10 genes (Quadri, Sello et al., 1998). El hecho de que un mutante en uno de estos genes, *mbtB*, falle en producir ambos tipos, demuestra una misma maquinaria de síntesis para ambas micobactinas (De Voss, Rutter et al., 2000). Al presente, aún se desconocen los genes responsables de la síntesis del grupo alquil que diferencia a ambos sideróforos, los cuales no se encuentran en el locus *mbt* ni se han encontrado en otro lado del genoma. Las 6 enzimas que van desde *mbtA* a *mbtF* forman una línea de ensamblaje ordenado de dominios responsable de activar y elongar los precursores del sideróforo a partir de ácido salicílico, serina, lisina y acil-coenzima A. Los demás genes del agrupamiento poseen funciones asignadas por comparación de secuencias. La enzima codificada por *mbtG* está involucrada en la hidroxilación de los residuos de lisina (Krithika, Marathe et al., 2006) mientras que *mbtJ* probablemente codifique para una estearasa o acetil-hidrolasa responsable de la transferencia de sustituyentes alquilo en las cadenas laterales de la lisina. MbtI podría estar involucrado en la biosíntesis de ácido salicílico. En el caso de *mbtH*, si bien está conservado incluso en otros agrupamientos génicos que codifican para NRPS, su probable función no está aclarada.

En el mismo trabajo donde se identificó el agrupamiento génico responsable de la síntesis de las micobactinas, también se identificó otro gen esencial, *pptT*, fuera del locus *mbt*, responsable de transformar los dominios apo-ArCPs, apo-PCPs y apo-ACPs en los dominios funcionales holo-ArCP, holo-PCPs y holo-ACPs (Quadri, Sello et al., 1998).

1.7 Adquisición de hierro por *Y. pestis*

El grupo *Yersinia* posee sistemas para la adquisición y almacenamiento de Fe ya sea

que este sea de origen orgánico como hemina a través del sistema Hmu (Hornung, Jones et al., 1996) o del sistema de hemóforos HasA (Rossi, Fetherston et al., 2001), o de origen inorgánico a través de los sistemas Yfe, Yfu (Gong, Bearden et al., 2001) o Ybt, que pueden actuar ya sea en el intestino de la pulga o durante el crecimiento intra y extracelular cuando infecta a mamíferos (Perry, Balbo et al., 1999). El hecho de que un triple mutante $Yfe^- Yfu^- Ybt^-$ posea un crecimiento residual en presencia de quelantes de hierro sugiere algún otro sistema además de los ya mencionados (Gong, Bearden et al., 2001). Otras observaciones sugieren otro mecanismo que estaría activo a 26°C e independiente de los sistemas anteriores (Lucier, Fetherston et al., 1996; Bearden and Perry, 1999).

El sistema Hmu (por “Hemin utilization”) adquiere hierro a través de una variedad de hemoproteínas y es independiente del sistema no nutricional de almacenamiento de hemina Hms (Hornung, Jones et al., 1996). Consta al menos de 5 componentes: HmuR, un receptor de membrana externa; HmuT-U y V, un probable transportador ABC y HmuS que podría participar en la remoción del hierro de la hemina (Thompson, Jones et al., 1999).

Los hemóforos HasA (por “heme acquisition system”) han sido descritos en *S. marcescens* (Letoffe, Ghigo et al., 1994), *P. aeruginosa* (Letoffe, Redeker et al., 1998), *P. fluorescens* (Idei, Kawai et al., 1999) y más recientemente en *Y. pestis* (Rossi, Fetherston et al., 2001). Son pequeñas proteínas extracelulares secretadas por un mecanismo ABC, con la capacidad de unir grupos hemos y transportarlo al receptor específico HasR. La observación de un mutante *hmu* capaz de crecer en concentraciones crecientes de hemoglobina, hizo que se especulara con la posibilidad de que este sistema fuera el responsable de ese crecimiento, pero una cepa $Has^+ Hmu^-$ no mostró ninguna diferencia con la doble mutante $Has^- Hmu^-$. La función de este sistema tampoco está claro, ya que las mismas cepas anteriores no mostraron ninguna diferencia en su virulencia en ratones, al menos cuando la infección se produjo por vía subcutánea (Rossi, Fetherston et al., 2001).

El sistema Yfu consta de 3 proteínas, A B y C, codificadas en el operón *yfuABC* que

pertenecen a la familia TC 3.A.1.10 de transportadores de hierro ABC. Aun no se sabe con certeza el rol o la importancia de este sistema en la patogénesis de *Y. pestis*. Cepas Y_{fu}^- no han mostrado ninguna diferencia con la cepa parental Y_{fu}^+ cuando fueron crecidas en medios de cultivos con baja concentración de hierro o en presencia de agentes quelantes, ni mostraron una reducción en su virulencia en experimentos con ratones (Gong, Bearden et al., 2001).

El sistema *Yfe* consta de cinco proteínas codificadas en dos operones distintos. El más grande de los dos, *yfeABCD*, codifica para un transportador ABC con una alta homología a los transportadores de cationes. Es regulado por hierro, Fur y se encuentra reprimido cuando es crecido en presencia de manganeso (Bearden, Staggs et al., 1998; Bearden and Perry, 1999).

1.7.1 Sideróforos

En 1975 se obtuvieron pruebas indirectas de que *Y. pestis* podía producir algún sideróforo (Wake, Misawa et al., 1975) y en 1987 se demostró, usando un ensayo en agar cromo azurol S capaz de detectar cualquier compuesto con capacidad de unir hierro independientemente de su naturaleza química (Schwyn and Neilands, 1987), la secreción de uno de estos sideróforos por una cepa virulenta de *Yersinia enterocolitica* (Heesemann, Hantke et al., 1993). Pero no fue hasta 1993 que se aisló y caracterizó yersiniobactina a partir de cultivos de *Y. enterocolitica* (Haag, Hantke et al., 1993) y hasta 1999 que se lo hizo en cultivos de *Y. pestis* (Perry, Balbo et al., 1999).

1.7.2 Genética

Jakson y Burrows relacionaron ya en 1956 un mecanismo de adquisición de hierro a 37°C con el fenotipo pigmentado (Pgm^+) de *Y. pestis* cuando estas eran crecidas a 26°C en presencia de hemina, y que la virulencia de cepas no pigmentadas (Pgm^-) podía ser restablecida si se inyectaba al mismo tiempo en forma intraperitoneal compuestos con hierro (Burrows and Jackson, 1956; Burrows and Jackson, 1956). El fenotipo Pgm^+ se debe a la región *pgm* (por pigmentación) de 102 kb (Fetherston, Schuetze et al., 1992; Lucier and Brubaker, 1992) la cual posee una tasa de delección espontánea de 10^{-5} ,

posiblemente por recombinación entre dos secuencias flanqueantes al locus *pgm* (Fetherston, Schuetze et al., 1992; Lucier and Brubaker, 1992; Fetherston and Perry, 1994). Las células *Pgm*⁺ forman colonias pigmentadas cuando estas son crecidas a 26°C (pero no a 37°C), en presencia de hemina o congo red. La hemina se observa y almacena intacta en la membrana externa a través de un sistema codificado en el locus *hms* (hemin storage) localizado en *pgm* (Perry, Pendrak et al., 1990; Pendrak and Perry, 1991).

La identificación de algunos de los genes responsables de la síntesis de yersiniabactina, primero como polipéptidos regulados por hierro y correlacionados con la virulencia de distintas cepas de *Yersinia* (Carniel, Mazigh et al., 1987; Carniel, Mazigh et al., 1987; Carniel, Mercereau-Puijalon et al., 1989; de Almeida, Guiyoule et al., 1993), permitió su localización dentro del cromosoma en una isla de alta patogenicidad (HPI por “High pathogenicity Island”) de aproximadamente 35 kb (Carniel, Guilvout et al., 1996; Bearden, Fetherston et al., 1997; Buchrieser, Prentice et al., 1998; Pelludat, Rakin et al., 1998; Buchrieser, Rusniok et al., 1999; Carniel, 1999; Perry, Balbo et al., 1999) dentro del locus *pgm* (Iteman, Guiyoule et al., 1993).

1.7.3 Estructura y biosíntesis de yersiniabactina

Yersiniabactina posee una estructura de 4 anillos sintetizados a partir de 5 unidades que son ensambladas en el siguiente orden: ácido salicílico, cisteína, cisteína, malonato y cisteína. Además posee 3 grupos metilos derivados de S-metil-adenosina (Haag, Hantke et al., 1993; Chambers, McIntyre et al., 1996; Gehring, DeMoll et al., 1998). Solo 4 proteínas son esenciales para la síntesis *in vitro* de yersiniabactina (Miller, Luo et al., 2002), en las cuales se distribuyen 17 dominios biosintéticos. Las demás proteínas del agrupamiento cumplen funciones *in vivo* como la conversión del corismato en ácido salicílico, tioesterasas, etc (Pfeifer, Wang et al., 2003). Al inicio, YbtE adenila una molécula de ácido salicílico para activarlo y transferirlo al dominio ArCP en el primer módulo de la proteína HMWP2 (Gehring, DeMoll et al., 1998). Los sucesivos dominios de esta última proteína activan y cargan en los correspondientes dominios PCPs dos moléculas de cisteína, las cuales son sucesivamente incorporadas y ciclizadas a la cadena creciente de yersiniabactina (Gehring, DeMoll et al., 1998; Suo, Walsh et al., 1999).

HMWP1 elonga la molécula agregando un malonato ya cargado en el primer módulo de esta proteína y lo reduce y metila. El último módulo de HMWP1 agrega, cicliza y metila una cisteína final antes de ser liberada la molécula por la función de una tioesterasa en el último dominio. Durante el proceso de síntesis, una cuarta enzima es necesaria para la modificación de yersiniabactina, la reductasa YbtU responsable de reducir el segundo anillo tioazolino (Miller, Luo et al., 2002).

1.8 Búsqueda de nuevos antimicrobianos

Desde la introducción de estreptomicina para tratar la tuberculosis en 1944, se vio la necesidad de usar combinaciones de drogas para evitar o reducir la aparición de cepas resistentes (Reichman and Hershfield, 2000). El tratamiento actual requiere la toma de más de una droga por un periodo de al menos 6 meses que, dependiendo de los casos, pueden requerir cursos de tratamientos más largos. En general, los diferentes regímenes de tratamiento incluyen las drogas de primera línea isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, y que han sido introducidas al mercado hace más de 40 años (Reichman and Hershfield, 2000).

El tratamiento y la prevención de la transmisión de la tuberculosis se ven complicados por múltiples factores entre los que se encuentran la falta de recursos en los países de mayor incidencia, la co-infección con VIH, la falta de desarrollo de nuevas drogas que puedan tratar las infecciones latentes y que puedan acortar el curso de tratamiento, de manera de disminuir el porcentaje de abandono del mismo antes de completarlo, ya que esto último es la principal causa de la emergencia de cepas multiresistentes (Reichman and Hershfield, 2000; Resch, Salomon et al., 2006). Si bien existe una vacuna contra la tuberculosis que es ampliamente usada (vacuna BCG), la protección que confiere es parcial y ha fallado en controlar la enfermedad en regiones altamente endémicas (Dietrich, Lundberg et al., 2006).

Para el tratamiento de la peste se recomienda el uso de estreptomicina, cloranfenicol y tetraciclinas (Dennis, Gage et al., 1999), pero la aparición de multiresistencias

(Galimand, Guiyoule et al., 1997; Guiyoule, Gerbaud et al., 2001) hacen imprescindible la búsqueda de nuevos antibióticos. Si bien existen vacunas con bacterias atenuadas o con bacterias muertas, la protección es variable y no protegen en caso de peste neumónica (Dennis, Gage et al., 1999).

2. OBJETIVOS

2 Objetivos

Debido al rol del hierro en el establecimiento de una infección, la necesidad de la bacteria para adquirirlo y al hecho de que la maquinaria biosintética de sideróforos no está presente en humanos, hacen a la ruta de producción de este último un excelente blanco para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

El conocimiento de la ruta biosintética y del mecanismo subyacente, así como la resolución de la estructura cristalina de algunas de las enzimas, provee una excelente oportunidad para el diseño de pequeñas moléculas capaces de inhibir reacciones específicas en la síntesis de los sideróforos y por consiguiente reducir o eliminar el crecimiento de la bacteria o su virulencia en condiciones de limitación de hierro.

Una de las reacciones que se dan tanto en la síntesis de yersiniabactina como de micobactinas es la de adenilación de los sustratos en donde se forma el intermediario salicil-AMP. Estos intermediarios se unen en forma no covalente al sitio activo con 2 o 3 órdenes de magnitud más fuerte que el ácido carboxílico y el ATP usados como sustratos para su generación. Inspirado por el producto natural nucleocidin, algunos análogos no hidrolizables de acil-AMP se han sintetizados en forma de acil sulfamoiil adenosina (acil-AMS) y se han mostrado capaces de inhibir la correspondiente enzima (Finking, Neumuller et al., 2003).

YbtE y MbtA catalizan la salicilación de un ArCP en la primera reacción de biosíntesis de yersiniabactina y micobactinas respectivamente, formando el mismo intermediario salicil-AMP, el cual permanece unido en forma no covalente al sitio activo hasta que se transfiere al ArCP.

Considerando que tanto YbtE como MbtA poseen un mecanismo similar a las enzimas inhibidas por los análogos no hidrolizables acil-AMS antes mencionados y que ambas enzimas generan el mismo intermediario, postulamos que un intermediario no hidrolizable salicil-AMS podría ser un potente inhibidor de la reacción de salicilación llevada a cabo por YbtE y MbtA.

Por todo lo anterior expuesto nos fijamos los siguientes objetivos:

- 1- Clonar y expresar las enzimas responsables de la salicilación del ArCP en la síntesis de yersiniabactina y micobactina.
- 2- Desarrollar un ensayo de salicilación *in vitro* factible de ser usado en una búsqueda a gran escala de compuestos que inhiban la reacción.
- 3- Sintetizar el análogo 5'-O-[N-(salicil)sulfamoil]-adenosine (salicil-AMS) y probar su actividad como inhibidor tanto en ensayos enzimáticos *in vitro* como en cultivos celulares de *M. tuberculosis* y *Y. pestis*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas, crecimiento y conservación

Las estirpes bacterianas de *E. coli*, *Y. pestis*, *M. tuberculosis* y *P. aeruginosa* utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Cepas utilizadas.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 <i>lacZ</i> \square M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>	Invitrogen, (Hanahan, 1983)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λcl^{ts}857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)</i>	Novagen, (Rosenberg, Lade et al., 1987)
<i>Y. pestis</i> KIM6 2082.1+	<i>Lcr⁻ Pgm⁺ (Ybt⁺) Hmu⁺ Yfe⁻ Yfu⁻ (ΔyfeAB2031.1) Yfu⁻ (ΔyfuA2082)</i>	Cedida por el Dr. R. Perry (Gong, Bearden et al., 2001)
<i>Y. pestis</i> KIM6 2082.1	<i>Lcr⁻ Pgm⁻ (Δpgm Ybt⁻) Hmu⁺ Yfe⁻ Yfu⁻ (ΔyfeAB2031.1) Yfu⁻ (ΔyfuA2082)</i>	Cedida por el Dr. R. Perry (Gong, Bearden et al., 2001)
<i>M. tuberculosis</i> H37rv		Colección del laboratorio
<i>M. tuberculosis</i> H37rv <i>mbtF</i>	<i>ΔmbtF</i>	Cedida por la Dra. K. Darwin (Darwin, Ehrt et al., 2003)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		Colección del laboratorio

Para la manipulación general, tanto *E. coli* como *P. aeruginosa* se crecieron en medio rico LB (Difco) a 37°C con agitación constante (220 rpm) o en placa añadiendo 1,5% de agar al medio.

M. tuberculosis se multiplicó en medio líquido Middlebrook 7H9, o en Middlebrook 7H11 agar (Difco) cuando se necesitó crecerlo en placas.

Y. pestis fue multiplicada en caldo de infusión de corazón (Heart Infusion Broth, Difco) a 37°C con agitación. Para el aislamiento de colonias, fue crecida a 37°C en placas en medio base agar sangre con triptosa (Triptose Blood Agar Base, Difco) sin el agregado de sangre. Para la confirmación de la presencia del locus de pigmentación *pgm*, *Y. pestis* se creció a 28°C durante 48-72 horas en agar rojo congo (Surgalla and Beesley, 1969)

cuya composición se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Agar rojo congo (Surgalla and Beesley, 1969) para la confirmación de la presencia del locus de pigmentación *pgm* en *Y. pestis*.

Componente	Cantidad
Caldo de infusión de corazón	1%
Agar	2%
Rojo Congo ^{ac}	0.005%
Galactosa ^{bc}	0.2%

^a preparado como una solución al 1% y esterilizado por filtración.

^b preparado como una solución al 20% y esterilizado por filtración.

^c agregados luego de autoclavar el medio

Cuando fue necesario se incluyeron los antibióticos correspondientes: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml) o cloranfenicol (40 µg/ml).

Todas las estirpes bacterianas se conservaron a -80°C en el medio de crecimiento con 15% (v/v) de glicerol.

3.2 Transformación bacteriana

Las transformaciones se realizaron tanto por el método de “heat-shock” o por electroporación. Células DH5α químicamente competentes, se obtuvieron de Invitrogen y la transformación se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Células DH5α electrocompetentes y células de la cepa de BL21 (DE3) competentes con el método de cloruro de calcio, fueron preparadas según lo reportado (Sambrook, Fritsch et al., 1989). Las transformaciones por “heat shock” se realizaron incubando las células con el plásmido correspondiente por 30 minutos en hielo, luego una incubación de 45 segundos a 42°C y una incubación final de 2 minutos nuevamente en hielo. Las electroporaciones se realizaron en cubetas de 0,2 cm (BioRad) aplicando 1,8V, 200 Ω y 25 µF (Gene Pulser II, BioRad). Una vez que las células se transformaron ya sea por “heat shock” o electroporación, se agregaron 800 µl de caldo de cultivo LB y se las incubó durante una hora a 37°C con agitación (220 rpm), para luego ser sembradas en platos con medio LB agar con el antibiótico correspondiente.

3.3 Manipulación del ADN

Para la amplificación de fragmentos de ADN, se usó la ADN polimerasa *pfu* (Invitrogen) que posee una alta fidelidad de síntesis por su actividad correctora de lectura.

Cuando fue necesario clonar algún fragmento, se hizo primariamente en el plásmido pCR2.1 (TOPO-TA Cloning System, Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor, para luego subclonarlo, una vez confirmada la secuencia, en el plásmido deseado. El clonado en pCR2.1 requiere que los productos de PCR posean extremos con una deoxiadenosina desapareada. Como la enzima *pfu* deja extremos romos, se usó la ADN polimerasa Taq (Invitrogen) que posee la capacidad de agregar este nucleótido extra. Para el subclonado de fragmentos en el plásmido de interés, una vez que estos se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes, se ligaron con la enzima ADN T4 ligasa (Invitrogen) a 16°C toda la noche, antes de ser transformados. Las clones se confirmaron por secuenciación en el Servicio de Recursos Biotecnológicos (Biotechnology Resource Center) de la Universidad de Cornell, el cual usa el método de secuenciación de “Byg Dye Terminators”.

El ADN plasmídico se obtuvo a partir de cultivos saturados de *E. coli* con el sistema de columnas QIAprep (Quiagen). La digestión del ADN con enzimas de restricción se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (New England Biolabs).

Rutinariamente, la separación electroforética de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa al 0,8-1,2% (p/v) (Invitrogen), en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). Cuando fue necesario purificar fragmentos a partir de geles de agarosa se usó el sistema comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según recomendaciones del proveedor.

3.4 Manipulación de proteínas

La separación electroforética de proteínas se realizó mediante geles de SDS-poliacrilamida (12%) discontinuos (Laemmli, 1970) en tampón de corrida (192 mM

glicina, 25 mM Tris, 0,1% SDS, pH 8,3). Para la visualización de proteínas, los geles se tiñeron con GelCode® Blue Stain Reagent (Pierce). La concentración de proteínas se midió en forma colorimétrica a través del reactivo Bio-Rad Protein Assay (BioRad).

3.5 Construcción de los plásmidos de expresión

Los plásmidos utilizados durante esta tesis se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Plásmidos utilizados. *Amp^r*: resistencia a ampicilina. *Kan^r*: resistencia a kanamicina. *Clo^r*: resistencia a cloranfenicol.

Nombre	Marcador / Utilidad	Referencia
pCR2.1 TOPO	<i>Amp^r</i> , <i>Kan^r</i> , <i>plac-lacZ'</i> Promotores <i>T7</i> y <i>Sp6</i> . Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Invitrogen
pSMT3	<i>Kan^r</i> . Promotores <i>T7</i> y <i>Lac</i> . Vector utilizado para la expresión de proteínas.	(Mosessoova and Lima, 2000)
pMBTA	Vector usado para la amplificación de <i>mbtA</i>	(Quadri, Sello et al., 1998)
pET22b-irp2ArCP	<i>Amp^r</i> . Plásmido utilizado para la expresión del dominio ArCP de la proteína HMWP2 con una cola de histidinas en el extremo C-terminal.	(Gehring, DeMoll et al., 1998).
pUS20-Sfp	<i>Clo^r</i> Plásmido para la co-expresión de la proteína Sfp con el dominio ArCP que se quiera modificar in vivo	(Couch, O'Connor et al., 2004)
pSMT3-MbtA	<i>Kan^r</i> . Plásmido utilizado para la expresión de MbtA	Este trabajo
pSMT3-YbtE	<i>Kan^r</i> . Plásmido utilizado para la expresión de YbtE	Este trabajo
pARCP	<i>Kan^r</i> . Plásmido utilizado para la expresión del dominio ArCP de la proteína MbtB, con una fusión N-terminal de MBP (por sus siglas en inglés de Maltose Binding Protein) y una cola de histidinas en el extremo C-terminal	(Quadri, Sello et al., 1998)
pET22-pcheArCP	<i>Amp^r</i> . Plásmido utilizado para la expresión del dominio ArCP de la proteína PchE con una cola de histidinas en el extremo C-terminal	Cedido por Hiten Patel

3.5.1 Construcciones de plásmidos y proteínas purificadas en trabajos anteriores

En este trabajo se expresó el dominio ArCP de la proteína HMWP2 fue expresada en este trabajo a partir del plásmido pET22b-irp2ArCP (Gehring, DeMoll et al., 1998). En esta construcción, el dominio ArCP de la proteína HMWP2, comprendiendo los residuos 1 a 100, fue clonado en el plásmido pET22b en los sitios *NdeI* y *XhoI* que le aporta una cola de histidinas con la secuencia LEHHHHHH en el extremo carboxi-terminal. Debido al diseño de los oligonucleótidos usados en la amplificación, los residuos 99 y 100 cambian de TP a SL.

Las proteínas PchD, Sfp y Ulp1 ya habían sido expresadas y purificadas con anterioridad a este trabajo. El gen *pchD* fue amplificado de ADN genómico de la cepa de *P. aeruginosa* PAO14 y clonado en el plásmido pET29b usando los sitios de restricción *NdeI* y *HindIII*. Esto genera una proteína de fusión donde una cola de histidinas (Hx6) codificada en el plásmido está fusionada al extremo carboxi-terminal de PchD (Quadri, Keating et al., 1999). La proteína Sfp se clonó en el plásmido pUC8 y se purificó por precipitación diferencial con sulfato de amonio y posterior separación por filtración en gel (Nakano, Corbell et al., 1992; Quadri, Weinreb et al., 1998). Por su parte, la proteasa Ulp1 (Mossesso and Lima, 2000) usada para la eliminación de la cola de histidinas de proteínas purificadas a partir del plásmido pSMT3 (ver siguiente apartado), fue clonada en el plásmido pET28b como proteína de fusión con una cola de histidinas en el extremo N-terminal, la cual, una vez que la proteína se purificó por una columna de afinidad, fue eliminada por digestión con trombina.

3.5.2 Clonado de *ybtE* y *mbtA*

Los genes que codifican para YbtE y MbtA fueron clonados en el plásmido pSMT3 (Mossesso and Lima, 2000), para generar proteínas de fusión inducibles por IPTG. El fragmento SMT3 del plásmido (figura 3.1), aporta 6 histidinas que permiten su posterior purificación en una columna de afinidad de níquel y la posterior eliminación del mismo por digestión enzimática con la proteasa Ulp1. Como se puede ver en la figura 3.1, después de la digestión la proteína queda con una serina extra, debido a que Ulp1 digiere después de la glicina codificada por el sitio de restricción *BamHI*, usado como

sitio de clonaje.

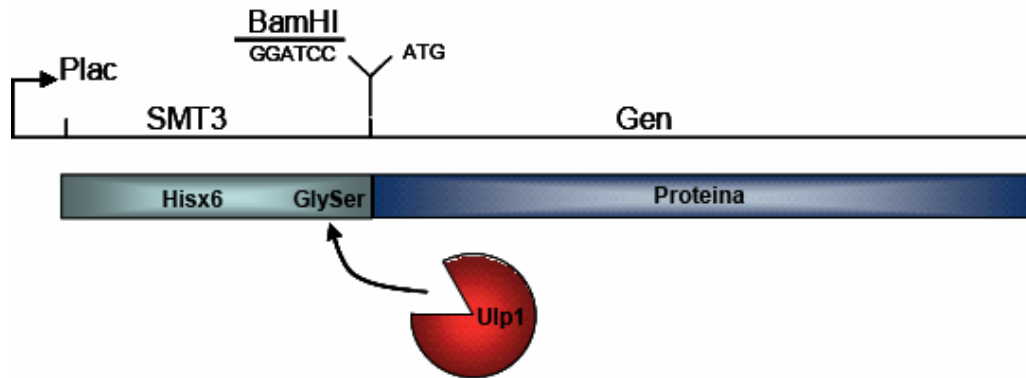


Figura 3.1. Detalle de la construcción en el plásmido pSMT3 para la expresión de MbtA y YbtE y la proteína de fusión resultante.

El gen *mbtA* fue amplificado por PCR a partir del plásmido pMBTA (Quadri, Sello et al., 1998) usando los oligonucleótidos JfmbtaF (5'-aaggag**gatcc**atgccaccgaaggcggcag-3') y JfmbtaR (5'-ttgaca**aagctt**caatggcagcgctgggtcg-3') y clonado en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pSMT3 (en negritas en los oligonucleótidos) para generar pSMT3-MbtA. Por su parte, *ybtE* fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *Y. pestis* Kim6+ usando los oligonucleótidos JfybteF (5'-aaaggg**gatcc**atgaattcttccttgaatc-3') y JfybteR (5'-ggttta**aagctt**atttgggcagaatggcgataac-3') e insertado en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pSMT3 para generar pSMT3-YbtE. Ambas construcciones fueron confirmadas por secuenciación.

3.6 Purificación de proteínas

Para la expresión de proteínas YbtE y MbtA, la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con los plásmidos correspondientes, fue crecida en 5 litros de medio LB más kanamicina (30 µg/ml) y con agitación constante (250 rpm) a 37°C. El cultivo se comenzó haciendo una dilución 1/100 de un cultivo previo en el mismo medio, crecido a saturación en las mismas condiciones. Cuando el crecimiento alcanzó una OD₆₀₀ de 0,6, se procedió a la inducción con 0,5 mM de IPTG durante 4 horas, después de la cual, el

cultivo fue centrifugado y las células resuspendidas en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 20% sucrosa, 1 mM BME, 1 mM PMSF, 10 mM imidazol, 0,1% IGEPAL). Esta suspensión se pasó 2 veces por French Press y el lisado obtenido se clarificó por ultra centrifugación durante 30 minutos a 40000 rpm.

Para la purificación, se aplicó el lisado a una columna de resina Ni-NTA-SuperFlow (Qiagen) usando el sistema AktaPrime, siguiendo las instrucciones del proveedor de la resina. Una vez que la columna fue lavada con tampón de lavado (75 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 M NaCl, 5% glicerol y 20 mM imidazol), y eluída con un gradiente creciente (de 0 a 100%) de tampón de elución (75 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 M NaCl, 5% glicerol y 350 mM imidazol). Las fracciones conteniendo la proteína se identificaron por SDS-PAGE y se dializaron toda la noche a 4°C frente a tampón de diálisis (0,2 M NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM DTT, 5% glicerol). La diálisis se realizó en presencia de la proteasa Ulp1 para eliminar el fragmento N-terminal SMT3 de la construcción. Para obtener una mayor purificación y para separar las proteínas del fragmento SMT3 ya digerido, las muestras se pasaron a través de una columna de filtración Superdex200 (Amersham) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y usando para la separación, un tampón que contenía 20 mM Tris-HCl pH 7,5 y 200 mM NaCl. Las fracciones conteniendo las proteínas, fueron concentradas y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C.

Para la purificación del dominio ArCP de la proteína HMWP2, el plásmido pET22b-irp2ArCP se co-transformó con el plásmido pUS20-Sfp para lograr la modificación del dominio *in vivo* por la incorporación del grupo 4'PP de la CoA. Para la expresión y purificación se siguió el mismo protocolo descrito para MbtA y YbtE pero sin el agregado de proteasa Ulp1 y de NaCl al tampón de diálisis. Antes de congelar la proteína en pequeñas alícuotas, la misma fue incubada con la enzima Sfp para asegurar el mayor porcentaje posible de modificación de apo a holo-ArCP (holo-ypArCP). La mezcla de reacción (75 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM CoA, 1 µM Sfp) fue incubada por 4 horas a 37°C.

Si bien no fueron utilizados en este trabajo, también se purificaron los dominios ArCP de las proteínas MbtB y PchE a partir de los plásmidos pARCP y pET-pcheArCP

respectivamente. El primero genera una proteína de fusión entre los primeros 88 aminoácidos de la proteína MbtB con la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo N-terminal, y con una cola de histidinas en el extremo C-terminal. Su expresión y purificación fue llevado a cabo según lo reportado (Quadri, Sello et al., 1998). En el segundo caso, el dominio ArCP de la proteína PchE (100 aminoácidos) fue clonado y expresado como una proteína de fusión con una cola de histidinas en el extremo C-terminal.

3.7 Síntesis del inhibidor

La síntesis del inhibidor salicil-AMS fue realizada por el laboratorio de Derek Tan, en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de la ciudad de Nueva York (ver anexo) (Ferrerias, Ryu et al., 2005).

3.8 Ensayo de adenilación y análisis de datos

La adenilación del sustrato ácido salicílico fue medida con el ensayo de intercambio [32 P]PPi/ATP como fue reportado previamente (Gehring, DeMoll et al., 1998; Quadri, Sello et al., 1998; Quadri, Keating et al., 1999).

Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en 100 μ l totales conteniendo 75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 10 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 5% glicerol; 1 mM sodio-[32 P]PPi (5 Ci/mol, Perkin Elmer) y, dependiendo del ensayo, diferentes concentraciones de ATP, ácido salicílico, enzima de adenilación (MbtA, YbtE o PchD) y el inhibidor diluido en DMSO (1% del volumen total de reacción). Las reacciones fueron llevadas a cabo a 37°C a tiempos variables, los cuales dependieron del ensayo que se llevó a cabo. Para parar la reacción, se agregó 1 ml de tampón de parada (1 mM PPi, 350 mM ácido perclórico, 1,6% carbón activado), y se mezcló con vortex para permitir la adsorción del ATP y/o [32 P]ATP al carbón activado. Este último, luego de ser colectado por centrifugación, fue lavado 3 veces con tampón de lavado (1 mM PPi, 350 mM ácido perclórico), y resuspendido finalmente en 500 μ l de agua. Para la medición, se transfirió todo el volumen a un vial con 2,5 ml de cóctel de centelleo para su medición en un

contador de centelleo.

Para el análisis de datos, se usaron los métodos descritos para inhibidores de unión fuerte (TBI por sus siglas en inglés) (Copeland, 2000). Las curvas de concentración-respuesta fueron ajustadas con la ecuación de Morrison:

$$\frac{v_i}{v_c} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{ap}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{ap})^2 - 4[E][I]}}{2[E]}, \quad \text{ecuación (1)}$$

donde v_i and v_c son las actividades medidas en las reacciones en presencia del inhibidor (I) o conteniendo DMSO respectivamente. K_i^{ap} es la constante de inhibición aparentemente y E es la enzima.

El IC_{50} (concentración a la cual se obtiene un 50 % de inhibición) fue calculado a partir de la ecuación

$$IC_{50} = \frac{1}{2}[E] + K_i^{ap}, \quad \text{ecuación (2)}$$

Las ecuaciones usadas para calcular K_i (constante de inhibición) se describen en la sección Resultados.

Para cada ensayo realizado, las concentraciones de enzima, sustratos y los tiempos de incubación, se describen en el apartado particular en la sección Resultados.

Todos los datos fueron ajustados usando el programa KaleidaGraph™ (Synergy Software).

3.9 Ensayo de salicilación

Los ensayos de salicilación del dominio ArCP fueron realizados en placas de 96 pocillos FlashPlate® PLUS (Perkin Elmer). Estas placas hacen uso de la tecnología SPA (por las siglas del inglés Scintillant Proximity Assay, ver apartado 4.3.2 en la sección Resultados) y poseen una cubierta de Ni^{2+} , que permite unir proteínas que posean una cola de histidinas.

La optimización del ensayo se describe en el apartado 4.3.2 en la sección

Resultados. Las condiciones de reacción finales que se usaron describen a continuación. Para la unión del dominio holo-ypArCP, las placas fueron incubadas durante 48 horas a 4°C, con 50 µl de tampón PBS, 0,8 mM DTT y 6 µM holo-ypArCP. Antes de la reacción, cada pocillo fue lavado dos veces con tampón PBS para eliminar la proteína no unida y luego escurrido para eliminar restos del tampón. Cada reacción fue llevada a cabo en 50 µl conteniendo 75 mM MES (pH 6,5), 1 mM TCEP, 100 µM ATP, 150 nM [³H]-ácido salicílico (33 Ci/mmol, Vitrex Inc.), 30 o 70 nM YbtE e inhibidor (agregado en DMSO al 1% del total de la reacción), a las concentraciones indicadas en la figura 4.26. Las reacciones fueron preparadas en dos etapas: en la primera se agregó la mezcla de reacción (30 µl) conteniendo todos los componentes excepto la enzima, la cual fue agregada en el segundo paso (20 µl) para comenzar la reacción. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1,5 horas. La reacción fue terminada agregando 300 µl de PBS conteniendo 1 mM ácido salicílico y lavado 1 vez más con 100 µl del mismo tampón. La formación del complejo [³H]-ácido salicílico-ypArCP-H6 fue cuantificada en un lector de placas TopCount[®] (Packard Bioscience). Las curvas de dosis-respuestas fueron ajustadas según la ecuación 1 y el IC_{50} calculado con la ecuación 2.

3.10 Ensayo de producción de sideróforos

Como la síntesis de sideróforos se induce ante una carencia de hierro en el medio de cultivo, las bacterias debieron crecer en medios sintéticos tratados con la resina Chelex 100 (BioRad) para la eliminación del hierro del mismo. La composición de los mismos se describe en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4: medio PMH-D (Staggs and Perry, 1991; Gong, Bearden et al., 2001) para el crecimiento de *Y. pestis* en condiciones de baja concentración de hierro.

Componente	Concentración final (mM)
PIPES	50
K ₂ HPO ₄	2,5
MgCl ₂ ^a	20
MnCl ₂ ^a	0,01
Na ₂ S ₂ O ₃	2,5
NH ₄ Cl	10
d-Biotina	0,002
Pantotenato de calcio	0,004
Tiamina	0,003
Glucosa	10
DL-Alanina	2,5
L-Arginina (hidrocloruro)	1
L-Asparagina	2,5
L-Aspartato	1
L-Glutamato	5
L-Glutamina	1
Glicina	5
L-Histidina	1
L-Isoleucina	1
L-Lisina	1
L-Metionina	1
L-Fenilalanina	1
L-Prolina	5
L-Serina	5
L-Treonina	2,5
L-Triptófano	0,1
L-Tirosina	1
L-Valina	1

El pH del medio se ajustó a 7,5 con NaOH 1M y se trató con 10 g/l. de Chelex 100 durante 16 horas para la eliminación de hierro. El medio se esterilizó por filtración.

^a agregado después del tratamiento con Chelex 100.

Tabla 5: Medio GAST-D (De Voss, Rutter et al., 2000) para el crecimiento de *M. tuberculosis* en condiciones de baja concentración de hierro.

Componente	Cantidad (por litro)
Bacto Casitona	0,3 g
Citrato de amonio férrico ^a	0,05 g
Acido cítrico	2 g
K ₂ HPO ₄	4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O ^b	1,2 g
L-Alanina	1 g
K ₂ SO ₄	0,6 g
NH ₄ Cl	2 g
NaOH 10M	1.8 ml
Glicerol	10 ml
Tween 80	0,5 ml

El pH del medio se ajustó a 6,6 y se trató con 10 g/l. de Chelex 100 durante 16 horas para la eliminación de hierro.
El medio se esterilizó por filtración.

^a fue omitido

^b agregado después del tratamiento con Chelex 100.

Tabla 6: medio DCAA (Palma, Worgall et al., 2003) para el crecimiento de *P. aeruginosa*, en condiciones de baja concentración de hierro.

Componente	Concentración final
Casaminoácidos	0,5%
MgCl ₂ .6H ₂ O ^a	0,4 mM

El pH del medio se ajustó a 7.2 y se trató con 10 g/l. de Chelex 100 durante 16 horas para la eliminación de hierro.
El medio se esterilizó por filtración.

^a agregado después del tratamiento con Chelex 100.

Para el análisis de la producción de sideróforos en *M. tuberculosis*, la cepa H37rv fue crecida por 3 días a 37°C sin agitación en 500 µl de medio GAST-D (Tabla 5) conteniendo [¹⁴C]-ácido salicílico (ARC) a 20 µM (55 mCi/mmol) para el marcaje del sideróforo, e inhibidor (200 µM) o DMSO (0,25% del volumen total) en los controles. El mutante *mbtF* (Darwin, Ehrt et al., 2003), deficiente en la producción de micobactinas, fue tratado con DMSO como se describió anteriormente y fue usado como un control negativo adicional. El cultivo se inició a una OD₅₈₀ de 0,2 a partir de un cultivo previo crecido en medio GAST-D durante 8 días, el cual fue centrifugado para colectar las células y resuspendido a la OD₅₈₀ deseada. Para la extracción de micobactinas asociadas a membrana, las células se colectaron por centrifugación y fueron incubadas durante 12 horas con 300 µl de etanol. Después de la incubación, los restos celulares se removieron por centrifugación y se agregó un volumen de agua y FeCl₃ (a 2,2 mM) al etanol sobrenadante. Las micobactinas asociadas a membrana, fueron extraídas de la mezcla dos veces con un volumen de CHCl₃. Para la extracción de micobactinas solubles, al sobrenadante del cultivo se le agregó FeCl₃ a una concentración final de 0,6 mM y luego se procedió a la extracción con CHCl₃ como se describió anteriormente. Los extractos fueron secados por evaporación y resuspendidos en CHCl₃ antes del análisis por cromatografía en capa delgada (TLC) en placas Al Sil G/UV (Whatman), usando como solventes éter de petróleo/1-butanol/acetato de etilo 2:3:3. Las placas fueron expuestas a una pantalla de Phosphorimager por 72 horas y analizada con un Storm Phosphoimager (Molecular Dynamics).

Para el análisis de producción de sideróforos en *Y. pestis* se usó la cepa avirulenta KIM6-2082.1+ (Gong, Bearden et al., 2001) la cual solo es capaz de producir yersiniabactina. La misma fue crecida en 200 µl de medio PMH-D (tabla 4) a 37°C con agitación (220 rpm), durante 15 horas. El mismo contenía [¹⁴C]-ácido salicílico y el inhibidor o DMSO como se describió anteriormente. El cultivo se comenzó a una OD₆₂₀ de 0,1 a partir de un cultivo previo crecido a saturación en el mismo medio. Como un control negativo extra, se usó la cepa KIM6 2082.1 (Gong, Bearden et al., 2001), deficiente en la producción de yersiniabactina, tratada solo con DMSO.

Para la extracción del sideróforo, el sobrenadante del cultivo fue extraído dos

veces con un volumen de acetato de etilo, el cual fue posteriormente evaporado. Yersiniabactina fue resuspendida en metanol y analizada por radio-TLC en una placa Al Sil G/UV, usando CHCl_3 /etanol/ácido acético (90:10:5) como solvente de corrida. La placa de TLC fue expuesta durante 24 horas a una pantalla de Phosphorimager, que fue luego analizada con un Storm Phosphoimager. La identidad de la marca de yersiniabactina (*rf*: 0,39), se confirmó por espectrometría de masas usando ionización química por presión atmosférica usando una muestra proveniente de un cultivo de 50 ml y purificada por una TLC preparativa. El análisis fue llevado a cabo por Cliff Soll en el laboratorio de espectrometría de masas de Hunter College, Nueva York.

En las condiciones empleadas, tanto *M. tuberculosis* como *Y. pestis* crecieron por aproximadamente dos generaciones antes de la extracción de los sideróforos. Este crecimiento tuvo lugar aún en la presencia del inhibidor debido ya sea a hierro residual, sideróforos o ambos, presentes en el relativamente alto inóculo usado para empezar los cultivos. Las muestras analizadas por TLC fueron corregidas por pequeñas diferencias en la densidad óptica presentes entre ellas.

Como el inhibidor salicil-AMS fue capaz de inhibir a la enzima PchD en los ensayos *in vitro*, quisimos ver además si este era capaz de inhibir la síntesis de sideróforos en cultivos bacterianos. Al no haber reportes previos de análisis de pioquelina por radio-TLC, primero evaluamos si éramos capaces de detectar la misma al marcarla con ácido salicílico radioactivo. *P. aeruginosa* PAO1 fue crecida a saturación en medio DCAA (Tabla 6), centrifugada y lavada 3 veces con medio DCAA, resuspendiendo finalmente a las células en el mismo medio a una OD_{600} de 0,2. Los ensayos se realizaron en 500 μl de esta dilución a los cuales se agregó [^{14}C]-ácido salicílico (ARC) a 30 μM (55 mCi/mmol) para marcar la producción de pioquelina. Para analizar la síntesis de pioquelina en condiciones de suficiencia de hierro, algunos cultivos fueron suplementados con 100 μM de FeCl_3 (Palma, Worgall et al., 2003). Los cultivos fueron incubados por otras dos horas a 37°C con agitación (220 rpm) cuando se procedió a la extracción de los sideróforos. La variación en el crecimiento que pudiese haber ocurrido luego de agregado el inhibidor se midió en una placa de 96 pocillos en un lector con 250 μl de cultivo. El cultivo usado para medir densidad óptica se volvió a juntar con el cultivo no usado y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Para la extracción de

pioquelina, el sobrenadante fue acidificado a un pH de aproximadamente 1,5-2,0 agregando HCl a una concentración final de 100 mM. El sideróforo se extrajo dos veces con 1 volumen de acetato de etilo, el cual fue posteriormente evaporado a sequedad a temperatura ambiente (Sokol, 1986). Como control la misma extracción se realizó del medio de cultivo tratado de la misma manera sin inocular. Para el análisis, pioquelina fue resuspendida en metanol y analizada por radio-TLC en una placa Al Sil G/UV, usando CHCl_3 /ácido acético/etanol (90:5:2,5) como solvente de corrida (Sokol, 1986). La placa de TLC fue expuesta durante 24 horas a una pantalla de Phosphorimager, que luego fue analizada con un Storm Phosphoimager.

Dos ensayos fueron llevados a cabo para analizar si salicil-AMS era capaz de inhibir la síntesis de pioquelina. En el primero de ellos se repitió el mismo experimento que se describió anteriormente, pero agregando el compuesto salicil-AMS a 400 μM o DMSO. En un segundo ensayo, las células fueron crecidas en DCAA hasta alcanzar una OD_{600} de aproximadamente 0,6, después de lo cual, las células fueron colectadas, lavadas 2 veces con medio DCAA fresco y finalmente resuspendidas en este mismo medio a una OD_{600} final de 0,6. De esta suspensión celular se tomaron 4 muestras de 500 μl cada una, tratando a dos de ellas con 0,8 mM salicil-AMS y a las otras dos con 0,94 μl DMSO. Para el marcado del sideróforo pioquelina, se agregó además [^{14}C]-ácido salicílico (ARC) a 30 μM (55 mCi/mmol). Cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 crecidos en DCAA suplementados con 100 μM de FeCl_3 fueron tratados de la misma manera y usados como control negativo. Cada muestra fue incubada nuevamente a 37°C con agitación por otros 30 minutos, al término de los cuales, las muestras se pusieron en hielo.

3.11 Ensayo de inhibición de crecimiento

La inhibición del crecimiento por el inhibidor salicil-AMS tanto en *M. tuberculosis* como en *Y. pestis*, fue analizada a través de diluciones seriadas del inhibidor en placas de 96 pocillos con 200 μl de medio por pocillo, en condiciones tanto de restricción como de suficiencia de hierro.

Para confirmar que podíamos detectar restricción en crecimiento por inhibición de la capacidad de sintetizar sideróforos, comparamos el crecimiento tanto de cepas de *M.*

tuberculosis como de *Y. pestis*, con delección en los sistemas de adquisición de hierro. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos con 200 µl de medio. Las cepas H37rv y *mbtF* (Darwin, Ehrt et al., 2003) de *M. tuberculosis* fueron crecidos en medio GAST-D y GAST-D suplementado con 20 µM de FeCl₃ durante 6 días a 37°C sin agitación. El crecimiento se midió leyendo OD₅₈₀ cada 24 horas. En *Y. pestis*, el crecimiento de la cepa KIM6 2082.1+, capaz de sintetizar solo yersiniabactina, fue comparada con el crecimiento de la cepa KIM6 2082.1, que no posee ninguno de los sistemas descritos de adquisición de hierro para *Y. pestis*, en condiciones de restricción de hierro y con concentraciones crecientes de FeCl₃ durante 22 horas a 37°C con agitación (220 rpm).

Para los ensayos de inhibición, la cepa H37rv de *M. tuberculosis* fue crecida en condiciones de deficiencia de hierro en medio GAST-D y suplementado con 200 µM de FeCl₃ para el crecimiento con suficiencia del mismo. Por su parte, *Y. pestis* KIM6-2082.1+ fue crecida en PMH-D y PMH-D suplementado con 200 µM de FeCl₃ para las condiciones de restricción y suficiencia de hierro respectivamente. El inhibidor salicil-AMS fue agregado en un rango de concentración de 0 a 200 µM para *M. tuberculosis* y de 0 a 400 µM para *Y. pestis*. En los controles sin tratar, DMSO fue agregado al 0,5% del volumen total. Los cultivos de *M. tuberculosis* fueron inoculados a una OD₅₈₀ de 0,01 y crecidos sin agitación durante 8 días a 37°C. Como inóculo, se usó un stock congelado a -80°C proveniente de un cultivo crecido en medio GAST-D durante 8 días, el cual fue colectado y lavado 3 veces con el mismo medio, y resuspendido finalmente en GAST-D con 15% de glicerol. Los cultivos de *Y. pestis* fueron inoculados a una OD₆₂₀ de 0,005 y crecidos durante 22 horas a 37°C con agitación (220 rpm). Los valores de IC₅₀ fueron calculados ajustando la curva de dosis-respuesta a la ecuación sigmoideal:

$$\frac{OD_i}{OD_c} = b + \frac{(a - b)}{1 + ([I]/IC_{50})^s}$$

donde DO_i y DO_c son las densidades ópticas de los cultivos tratados con el inhibidor y los tratados con DMSO respectivamente. Por su parte a representa la parte superior de la curva, b la inferior y s la inclinación o coeficiente de Hill. Para el ajuste de la curva se usó el programa de ordenador KaleidaGraph (Synergy Software).

4. RESULTADOS

4.1 Diseño y síntesis de salicil-AMS y AMS

El hecho de que las enzimas YbtE, MbtA y PchD, no tengan homólogos en los seres humanos y que la síntesis de sideróforos en la cual estas enzimas están involucradas, sea a su vez esencial en el proceso infeccioso, las hace especialmente atractivas para su uso como blanco para el diseño de nuevos antimicrobianos.

El mecanismo de acción de estas enzimas involucra la adenilación del ácido salicílico, usando ATP en el proceso y formando el intermediario salicil-AMP con la consiguiente liberación PPi. En un segundo paso, la enzima transfiere el grupo “salicil” del intermediario al grupo 4'PP del respectivo dominio ArCP, liberándose AMP (Figura 4.1A).

El mecanismo de adenilación anteriormente descrito, es compartido por otras enzimas de adenilación, entre las que se encuentran las enzimas que activan los correspondientes sustratos que forman los bloques de construcción de diferentes NRPSs, o aquellas responsables de la incorporación de los respectivos aminoácidos a los ARN de transferencia.

El hecho demostrado de que el intermediario formado por estas enzimas se une a ellas con una afinidad de varios órdenes de magnitud por encima de los sustratos a partir del cual se formó, induce a pensar que un compuesto que mimetice la estructura del mismo pero que reemplace la unión fosfato hidrolizable por una unión más estable, podría funcionar como un excelente inhibidor de la reacción de adenilación.

En este contexto, el producto natural nucleocidin (Figura 4.1B4), un antibiótico producido por *Streptomyces calvus* (Florini, Bird et al., 1966), sirvió como modelo para el reemplazo de la unión fosfato en el intermediario salicil-AMP (Figura 4.1B1), por un grupo sulfamato, generando el compuesto 5'-O-(N-salicilsulfamoil) adenosina (salicil-AMS) (Figura 4.1B2). La misma estructura pero sin el grupo salicil, denominado sulfamoil adenosina (AMS), se sintetizó para ser usado como control (Figura 4.1B3).

Basados en este mismo principio, otros acil-AMS han sido sintetizados, comprobándose que inhiben específicamente la síntesis de ciertas ARN_t sintetasas (Kim, Lee et al., 2003; Lee, Kim et al., 2003), de algunos dominios de adenilación de NRPS

(Finking, Neumuller et al., 2003) o, más recientemente, de la enzima responsable de activar y agregar D-alanina a los ácidos lipoteicoicos en bacterias gram negativas (May, Finking et al., 2005).

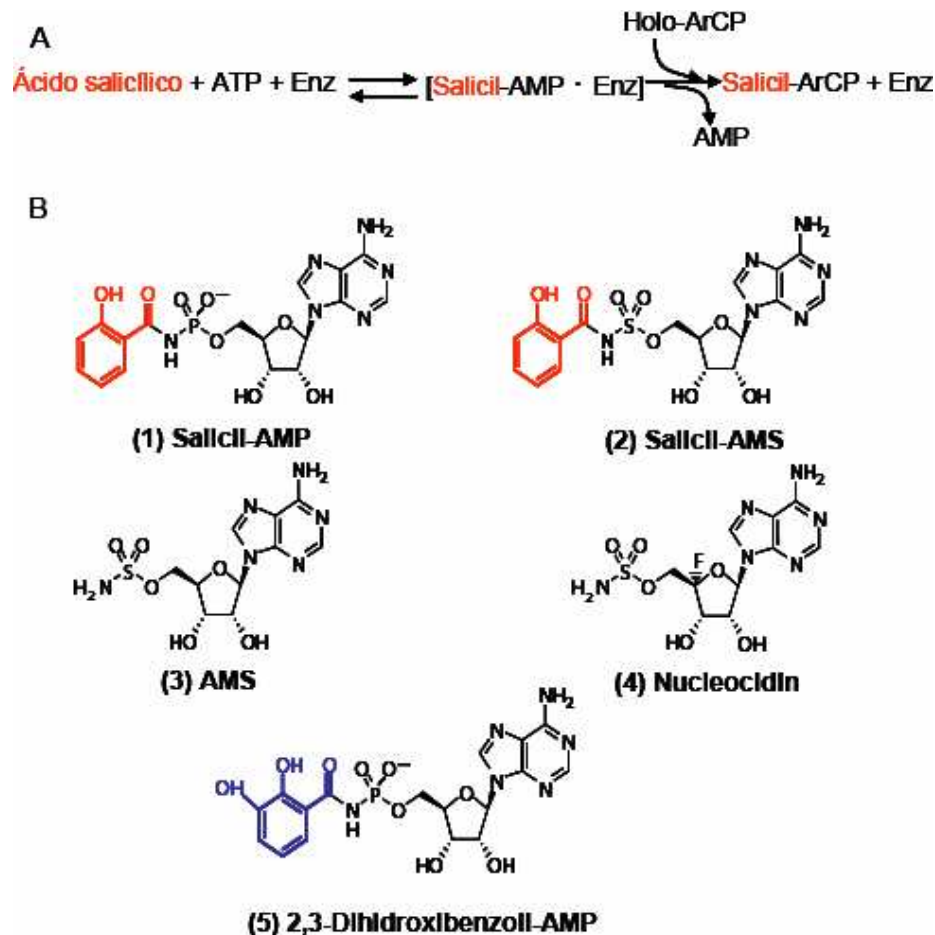


Figura 4.1 Reacción de salicilación del dominio ArCP en dos pasos y estructura de los intermediarios aroil-adenilatos y compuestos relacionados. (A) Reacción de salicilación del dominio ArCP en dos pasos. (B) Estructura del intermediario salicil-AMP, 1; su análogo no hidrolizable salicil-AMS, 2; AMS, 3; antibiótico relacionado nucleocidin, 4; intermediario 2,3-dihidroxi-benzoyl-AMP

La resolución de la estructura cristalina de la enzima DhbE, responsable de la activación del ácido 2,3 dihidroxi-benzoico (DHBA) en la síntesis del sideróforo bacilobactina por *Bacillus subtilis*, junto con su intermediario DHBA-AMP (May, Kessler et al., 2002) (Figura 4.1B5), nos permitió determinar aquellos residuos que probablemente son importantes en la interacción entre la enzima y el intermediario (Figura 4.2A). El alineamiento de las secuencias proteicas de DhbE, YbtE, MbtA, PchD y otras enzimas de adenilación de grupos aroil relacionadas, permitió comprobar que, a

pesar que estas muestran porcentajes de identidad de entre un 40-50%, estos residuos

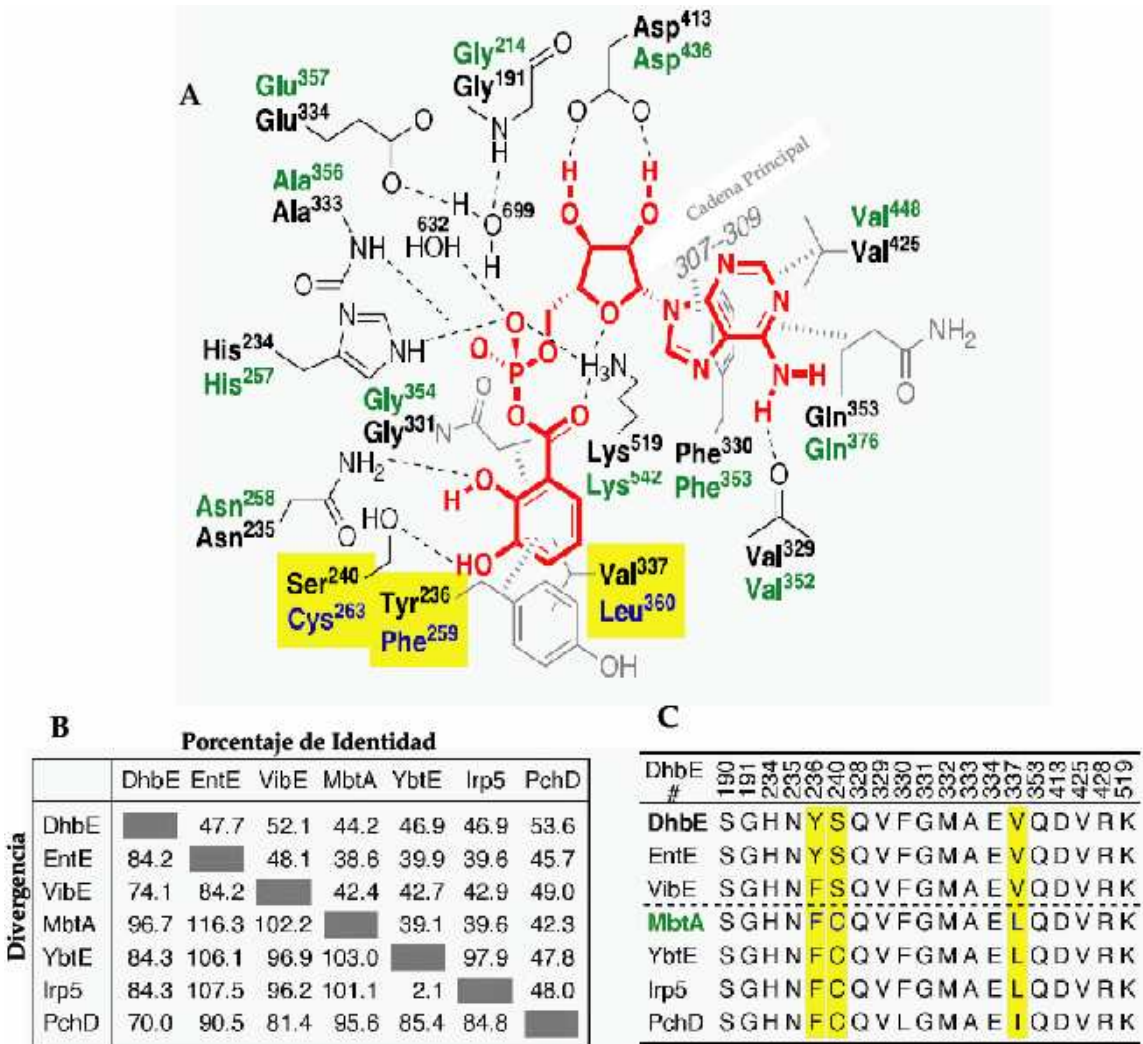


Figura 4.2: Análisis estructural del sustrato activado a las enzimas de adenilación. (A) Probable uniones de hidrógeno (-----) e interacciones hidrofóbicas (.....) del intermediario 2,3-dihidroxibenzoil-AMP (en rojo) con la enzima DhbE (en negro) con los correspondientes residuos conservados (en verde) y residuos análogos de MbtA (en azul). (B) Comparación de secuencias entre proteínas que adenilan ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DhbE, EntE y VibE), y enzimas que adenilan ácido salicílico (MbtA, YbtE, Irp5 y PchD). Irp5 es la probable proteína homóloga de YbtE en *Y. enterocolitica*, por eso la alta homología que presentan entre las dos. (C) Alineamiento de los probables residuos de unión de los dominios de adenilación del ácido 2,3-dihidroxibenzoico y ácido salicílico. Números de acceso a GenBank: NP_391078, NP_415126, AAC45927, NP_216900, NP_405468, T30345, NP_252918.

están conservados en todas ellas, excepto por pequeñas diferencias que podrían estar involucradas en la especificidad hacia el ácido salicílico en contraposición con DHBA (Figura 4.2B y C). Esto sugiere que el intermediario salicil-AMP se une a MbtA, YbtE y PchD de manera similar y que, por lo tanto, el análogo salicil-AMS debería inhibir a las tres enzimas por igual. Además, como la unión del grupo fosfato del intermediario 2,3-

dihidroxibenzoil-AMP parece involucrar primariamente uniones de hidrógenos más que interacciones electroestáticas, creemos que el grupo sulfamato sin carga puede ser un buen reemplazo del grupo fosfato en el intermediario salicil-AMP.

4.2 Expresión y purificación de proteínas

Para este trabajo se utilizaron 8 proteínas, de las cuales PchD (Figura 4.3 carril 5), Sfp y Ulp1 (Figura 4.3 carriles 1 y 2 respectivamente) ya contábamos con alícuotas previamente purificadas, mientras que *ypArCP-6H*, *tbArCP-6H* y *paArCP-6H* (Figura 4.3 carriles 6, 7 y 8 respectivamente) fueron expresadas y purificadas a partir de plásmidos de expresión construidos con anterioridad. Por su parte en este trabajo se clonaron, expresaron y purificaron las enzimas YbtE y MbtA (Figura 4.3 carriles 3 y 4).

A fin de poder evaluar la capacidad del compuesto salicil-AMS como inhibidor de la reacción de activación del ácido salicílico, necesitábamos contar con las enzimas necesarias para generar la reacción de adenilación *in vitro* para los tres sistemas: YbtE de *Y. pestis*, MbtA de *M. tuberculosis*, y PchD de *P. aeruginosa*. Los genes de las enzimas YbtE y MbtA fueron amplificados a partir de ADN genómico la primera, y del plásmido pMBTA (Quadri, Sello et al., 1998) la segunda, y clonados en el plásmido pSMT3 (Mossesso and Lima, 2000). El uso del plásmido pSMT3 posee la ventaja de poder obtener la proteína de interés prácticamente sin mayores modificaciones en su secuencia, ya que la cola de histidinas en el extremo N-terminal que este plásmido aporta, y que permite la purificación a través de una columna de afinidad, ofrece la posibilidad de ser eliminada a través de la digestión enzimática con la proteína Ulp1, quedando solamente una serina extra en el extremo N-terminal como única modificación. Estas construcciones fueron transformadas en la cepa BL21 (DE3) para la expresión y purificación de las enzimas correspondientes. Ambas proteínas fueron solubles cuando su expresión fue inducida por IPTG a 37°C. Después de la purificación por afinidad, estas enzimas fueron dializadas para reducir la concentración de imidazol en presencia de la enzima Ulp1 que resultó en la eliminación de la cola de histidinas. La posterior purificación por filtración en gel, permitió la obtención de estas enzimas con un alto grado de pureza, libres de enzimas no digeridas o de las colas de histidinas liberadas después de la digestión.

La otra enzima de adenilación que habíamos predicho que podría ser inhibida por el compuesto salicil-AMS, era la enzima de *P. aeruginosa* PchD. Para probarlo, ya contábamos con alícuotas de la proteína purificadas con anterioridad a este trabajo (Quadri, Keating et al., 1999). Para esta purificación, PchD fue expresada como una proteína de fusión con una cola de histidinas en su extremo carboxilo terminal. Su capacidad para activar ácido salicílico y transferirlo al dominio ArCP de PchE se comprobó *in vitro* (Quadri, Keating et al., 1999) y se determinó la K_m para el ácido salicílico en 2,8 μ M a través de ensayos de intercambio [32 P]PPi/ATP.

Como también quisimos ver si la inhibición del intercambio [32 P]PPi/ATP se correspondía con la inhibición del segundo paso de la reacción catalizada por estas enzimas, la transferencia del sustrato activado al dominio ArCP correspondiente, decidimos desarrollar un ensayo *in vitro* para probarlo, usando el sistema enzimático de *Y. pestis* (ver apartado 4.3.2).

Para este ensayo, además de la enzima YbtE necesitábamos el dominio ArCP al cual la enzima transfiere el sustrato activado. Como el ensayo se realizó en placas multipocillos y a su vez requería que el dominio ArCP permaneciera unido a las paredes de los pocillos, esta proteína se clonó con una cola de histidinas que nos permitió fijarlo a una cubierta de Ni^{++} presente en los pocillos (ver apartado 4.3.2).

Si bien el dominio ArCP en *Y. pestis* forma parte del extremo N-terminal de la enzima multidominio HMWP2, se demostró previamente que puede ser modificado con el grupo 4'PP y sufrir la salicilación del mismo cuando es expresado como un dominio simple fuera de su contexto proteico (Gehring, Mori et al., 1998). En ese trabajo, el dominio comprendiendo los aminoácidos 1 a 100, fue clonado en el plásmido pET22b, para generar una proteína de fusión con una cola de histidinas carboxilo terminal (*ypArCP-6H*). Esta misma construcción, fue la que utilizamos para transformar la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* para expresar y purificar el dominio ArCP para ser usado en nuestros ensayos. Esta proteína fue co-expresada con el plásmido pUS20-SFP que codifica para la enzima SFP de *B. subtilis*, a fin de lograr el mayor porcentaje posible de modificación de apo a holo-ArCP *in vivo* por la incorporación del grupo 4'PP de CoA necesario para su funcionalidad. El dominio se expresó en forma soluble y se consiguió

un alto nivel de pureza después de la purificación por la columna de Ni^{++} . Antes de guardar la proteína en alícuotas a -80°C , la misma se incubó en presencia de la enzima SFP y CoA, para asegurar el máximo de modificación. La enzima SFP utilizada para esta modificación *in vitro*, provino de alícuotas mantenidas a -80°C de una purificación anterior a este trabajo. La misma fue purificada de la fracción soluble por precipitación diferencial con cloruro de amonio y una filtración en gel posterior (Quadri, Weinreb et al., 1998). Su actividad enzimática fue comprobada monitoreando la incorporación del grupo 4'PP de $[^3\text{H}]\text{CoA}$ en un dominio PCP de la sintetasa de surfactina, un antibiótico producido por *Bacillus subtilis*.

En este trabajo solo usamos el dominio *ypArCP-6H* de *Y. pestis* para los estudios de inhibición de la salicilación, aunque también fueron purificados los dominios *tbArCP-6H* y *paArCP-6H* para futuros ensayos.

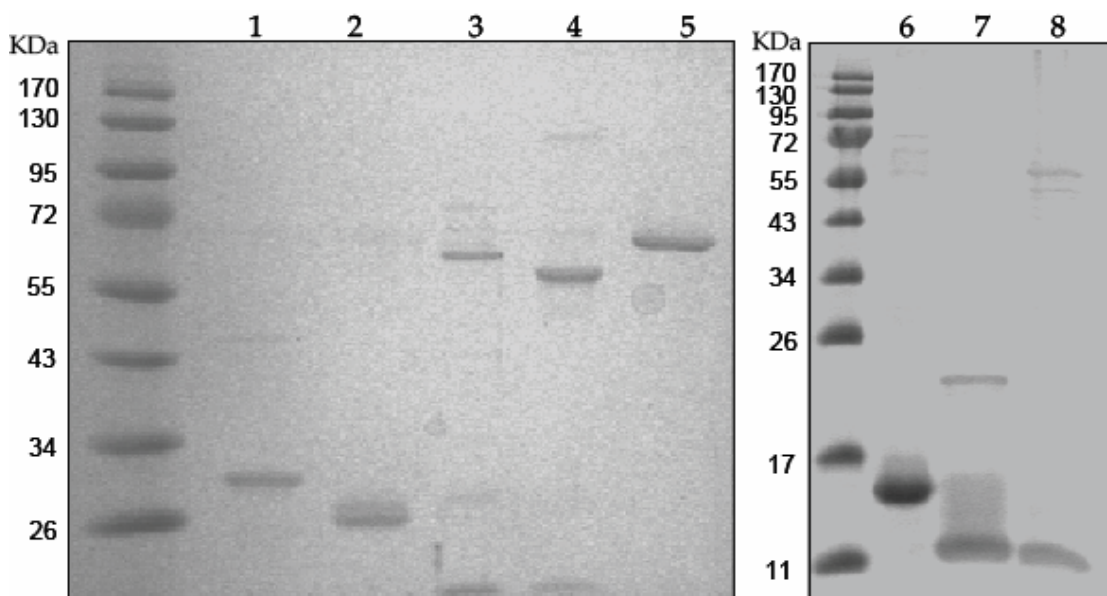


Figura 4.3: Proteínas usadas en este trabajo. Carriles 1 a 5, SDS-PAGE al 12.5%. Carriles 5 a 8 SDS-PAGE al 15%. Carril 1: Sfp, carril 2: Ulp1(403-621), carril 3: MbtA, carril 4: YbtE, carril 5: PchD, carril 6: holo-*ypArCP-6H*, carril 7: holo-*tbArCP-6H*, carril 8: holo-*paArCP-6H*

4.3 Ensayos de inhibición *in vitro*

Las formas por las cuales se puede inhibir una enzima son variadas y los inhibidores pueden presentar distintas formas de interacción con la misma que,

dependiendo de si es una interacción reversible, irreversible o de unión fuerte, determinará la metodología a ser usada para su estudio.

Como el intermediario natural salicil-AMP posee una afinidad por la enzima de varios ordenes de magnitud mayor a los sustratos ácido salicílico y ATP, esperábamos que sucediera lo mismo con el compuesto salicil-AMS, comportándose como un tipo especial de inhibidores denominados inhibidores de unión fuerte o TBI (por sus siglas en ingles Tight Binding Inhibitors). Esta clase especial de compuestos se une a la enzima de tal manera que el complejo enzima-inhibidor posee una muy baja constante de disociación, presentando constantes de inhibición (K_i) cercanos a la concentración de la enzima. Esto hace que, aunque si bien no llegan a ser inhibidores irreversibles debido a que no se genera una unión covalente con la enzima, para los fines prácticos son tratados como tales.

Como se describe en el apartado 1.5.2 de la introducción, YbtE, MbtA y PchD poseen, al igual que otras enzimas de adenilación, una actividad enzimática compuesta de dos etapas bien diferenciadas. En la primera activan el sustrato ácido salicílico con ATP formando un complejo enzima:salicil-AMP y PPi. En la segunda etapa, el sustrato activo es transferido al grupo 4'PP del ArCP correspondiente liberándose AMP.

El primer paso de la reacción es reversible, pudiéndose regenerar el ATP a partir de salicil-AMP y PPi, mientras que el segundo paso no lo es. Como ambas etapas de la reacción pueden ser estudiadas en forma separadas, la capacidad de inhibición del compuesto salicil-AMS fue analizado aplicando metodologías que miden cada proceso en forma particular.

4.3.1 Ensayo de adenilación por intercambio [^{32}P]PPi/ATP

Estos ensayos se basan en la capacidad de las enzimas de adenilación de realizar la reacción reversa de activación del sustrato, en este caso ácido salicílico, generando ATP a partir de PPi y del AMP unido al sustrato activado. El ensayo usa [^{32}P]PPi que, por acción enzimática, es incorporado al ATP (quedando así [^{32}P]ATP) el cual, a su vez, es atrapado diferencialmente por el carbón activado usado para parar la reacción. De esta manera se mide la radioactividad que queda solo en el ^{32}P que se incorporó al ATP por acción enzimática (Figura 4.4).

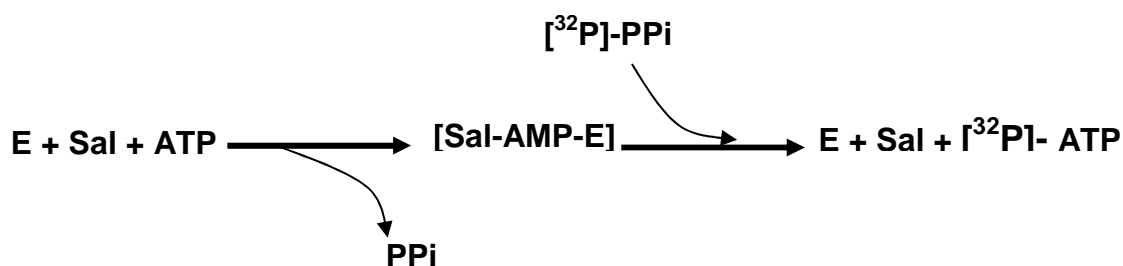


Figura 4.4 Diagrama del ensayo de intercambio de PPI. E: enzima, Sal: ácido salicílico

A fin de comprobar que estábamos usando las condiciones adecuadas de reacción para la determinación del tipo de inhibidor y su relación con la enzima, se determinaron algunos parámetros cinéticos para la enzima YbtE, como curva de avance de la reacción en función del tiempo, y los valores de K_m para ambos sustratos, ATP y ácido salicílico.

La curva de avance de reacción en función del tiempo nos permitió determinar un tiempo de análisis de la reacción de 15 minutos, ya que a este tiempo la misma presenta una respuesta lineal antes de alcanzar el equilibrio, lo cual es importante para las curvas de concentración-respuesta en el análisis de inhibición (Figura 4.5).

La K_m para el ATP y el ácido salicílico para la reacción reversible de formación de salicil-AMP, fue determinado en $172,19 \pm 31,8 \mu\text{M}$ y $5,38 \pm 0,54 \mu\text{M}$ respectivamente (Figura 4.6), siendo estos valores semejantes a los valores reportados previamente que mostraban una K_m de $350 \mu\text{M}$ para el ATP y $4,6 \mu\text{M}$ para al ácido salicílico (Gehring, Mori et al., 1998). Este último también esta de acuerdo con la K_m reportada para el ácido salicílico por la enzima PchD ($2,8 \mu\text{M}$) (Quadri, Keating et al., 1999) y por la enzima MbtA ($9 \mu\text{M}$) (Quadri, Sello et al., 1998). Estos valores también son comparables con lo reportado para la enzima EntE, la enzima de adenilación responsable de la activación del ácido 2,3 di-hidrobenczoico en la síntesis del sideróforo enterobactina en *E. coli*, cuya K_m para el sustrato es de $2,7 \mu\text{M}$ (Rusnak, Faraci et al., 1989).

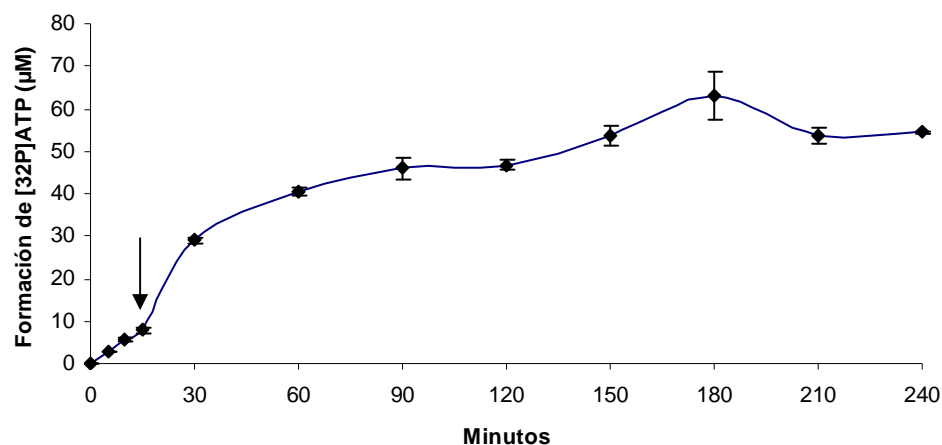


Figura 4.5: Reacción de adenilación por YbtE (20 nM) en función del tiempo. La actividad está expresada como concentración (en μM) de ATP marcado por la actividad de intercambio $[^{32}\text{P}]\text{PPi}/\text{ATP}$ de YbtE. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

Para tener una primera aproximación acerca de la capacidad de inhibición del compuesto salicil-AMS, se realizaron curvas de concentración-respuesta para las tres enzimas: YbtE, MbtA y PchD, a concentraciones saturantes de sustratos (1 mM ATP y 1 mM de ácido salicílico) y a un rango de concentraciones de salicil-AMS cercano a la concentración de enzima utilizada (20 nM), de manera de calcular los valores de IC_{50} (concentración de inhibidor a la cual, a una concentración fija de enzima y de sustrato, se alcanza un 50 % de inhibición).

Los valores obtenidos de las curvas, graficadas como fraccional de la velocidad inicial en función de la concentración de inhibidor, fueron de $14,7 \pm 2,0$ nM para YbtE, $10,7 \pm 2,0$ nM para MbtA y $12,5 \pm 2,2$ nM para PchD (Figura 4.7). Estos valores son aproximadamente la mitad de la concentración de la enzima que se utilizó en el ensayo y es consistente con una relación estequiométrica 1:1 con la enzima. Este tipo de relación entre inhibidor y enzima, donde los valores de IC_{50} son similares a la concentración de enzima utilizada dentro de un rango de 10 veces, es característico de los inhibidores TBI (Copeland, 2000), indicando que el compuesto salicil-AMS posiblemente lo fuera, tal cual se esperaba cuando se diseñó el compuesto.

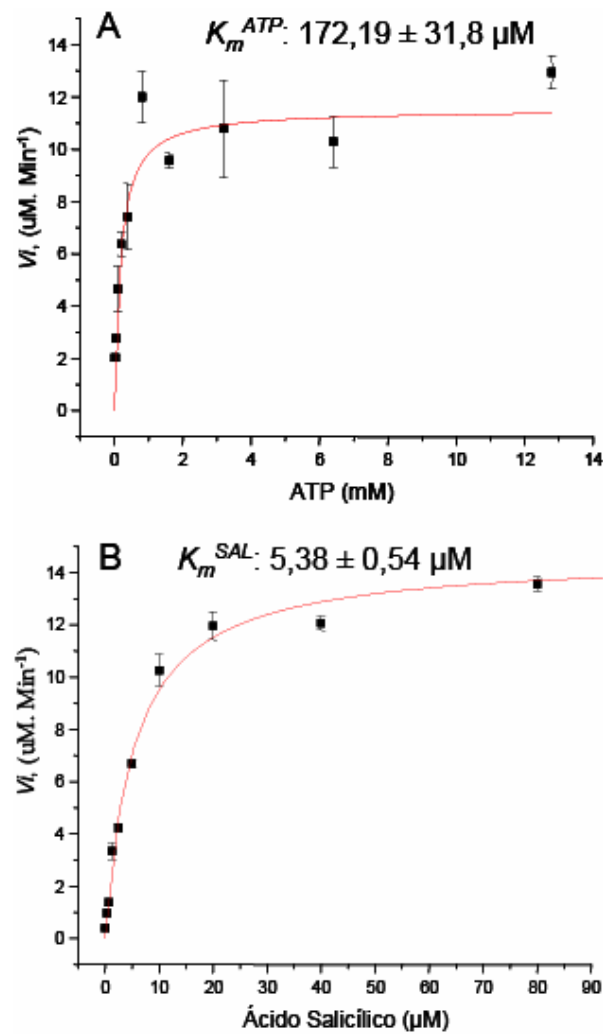


Figura 4.6: Cálculo de K_m para los sustratos ATP y ácido salicílico en la reacción de adenilación por YbtE (20 nM). El gráfico representa la velocidad inicial (V_i), expresada como concentración en μM por minuto, de ATP marcado por la actividad de intercambio $[^{32}P]PPi/ATP$ de YbTE, como función de la concentración de ATP (A) o ácido salicílico (B). En el gráfico A la concentración de ácido salicílico se mantuvo constante en 1 mM mientras que en el gráfico B, la concentración de ATP se mantuvo constante en 1 mM. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

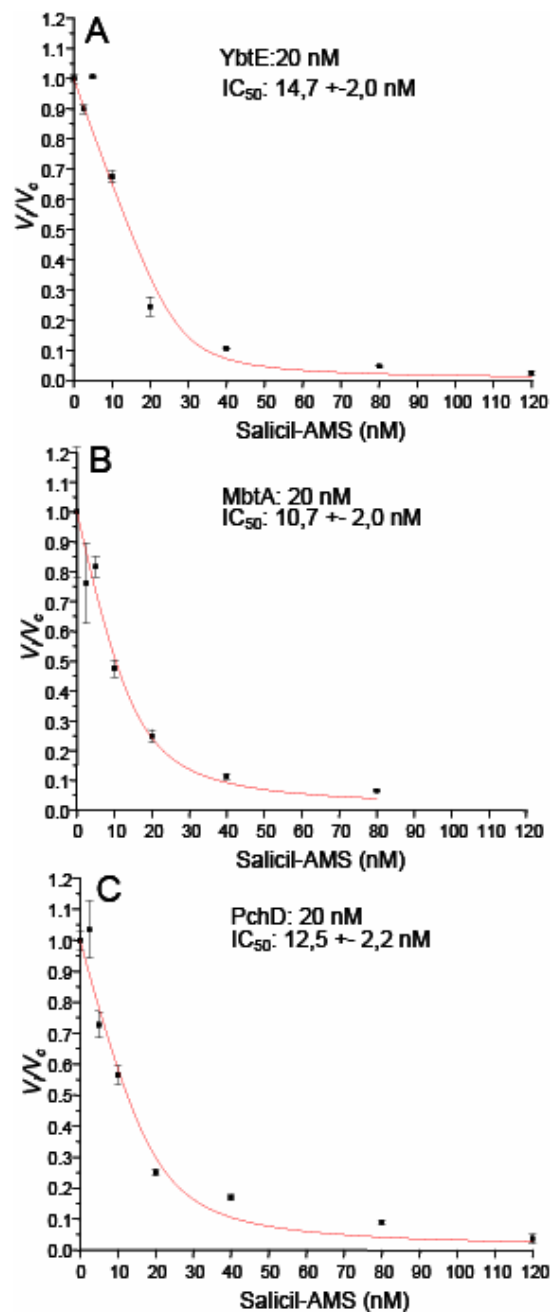


Figura 4.7: Inhibición de la reacción de adenilación de las enzimas YbtE (A), MbtA (B) y PchD (C) por salicil-AMS. Las curvas de dosis respuestas están graficadas como la fraccional de la velocidad como función de la concentración de salicil-AMS. V_i y V_c representan la velocidad en presencia de salicil-AMS y DMSO respectivamente. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

Como se observa en la ecuación desarrollada por Esson y Estdman en 1936 (Copeland, 2005) para los inhibidores de unión fuerte

$$IC_{50} = \frac{1}{2}[E] + K_i^{ap}$$

donde K_i^{ap} representa la constante de inhibición aparente, el IC_{50} está determinado por la concentración de enzima utilizada en el ensayo y por el K_i del inhibidor. Debido a ello, una de las formas más directas de determinar que un inhibidor es realmente del tipo de unión fuerte, es analizar la variación del IC_{50} cuando, a concentraciones de sustratos constantes se varía la concentración de enzima. Debido a la interacción directa entre la enzima y el inhibidor, los valores de IC_{50} varían en forma lineal cuando estos se grafican en función de la concentración de enzima, mostrando una pendiente de 0,5 (Copeland, 2000).

A fin de confirmar esta relación, decidimos determinar si este era el caso con el compuesto salicil-AMS, por lo que procedimos a realizar curvas de concentración-respuesta a concentraciones saturantes de ATP y ácido salicílico pero variando la concentración de YbtE (figura 4.8 A-E). Al graficar los valores de IC_{50} con respecto a la concentración de enzima obtuvimos una respuesta lineal (figura 4.8 F) con una pendiente de 0,42 (R^2 : 0,9594) cuando se graficaron los valores de IC_{50} en función de la concentración nominal de enzima utilizada, mientras que la pendiente fue de 0,52 (R^2 : 0,9999) cuando los datos se corrigieron a la concentración de enzima calculada por la ecuación de Morrison (ver ecuación 1 en Materiales y Métodos). Estos datos apoyan definitivamente la idea de que el compuesto salicil-AMS es un inhibidor de unión fuerte.

Los inhibidores enzimáticos, además de poder presentar un tipo de inhibición reversible, irreversible o de unión fuerte, pueden presentar, dentro de estas, distintas modalidades de inhibición con respecto a los sustratos de la enzima, como son una inhibición competitiva o no competitiva con respecto a los sustratos de la enzima.

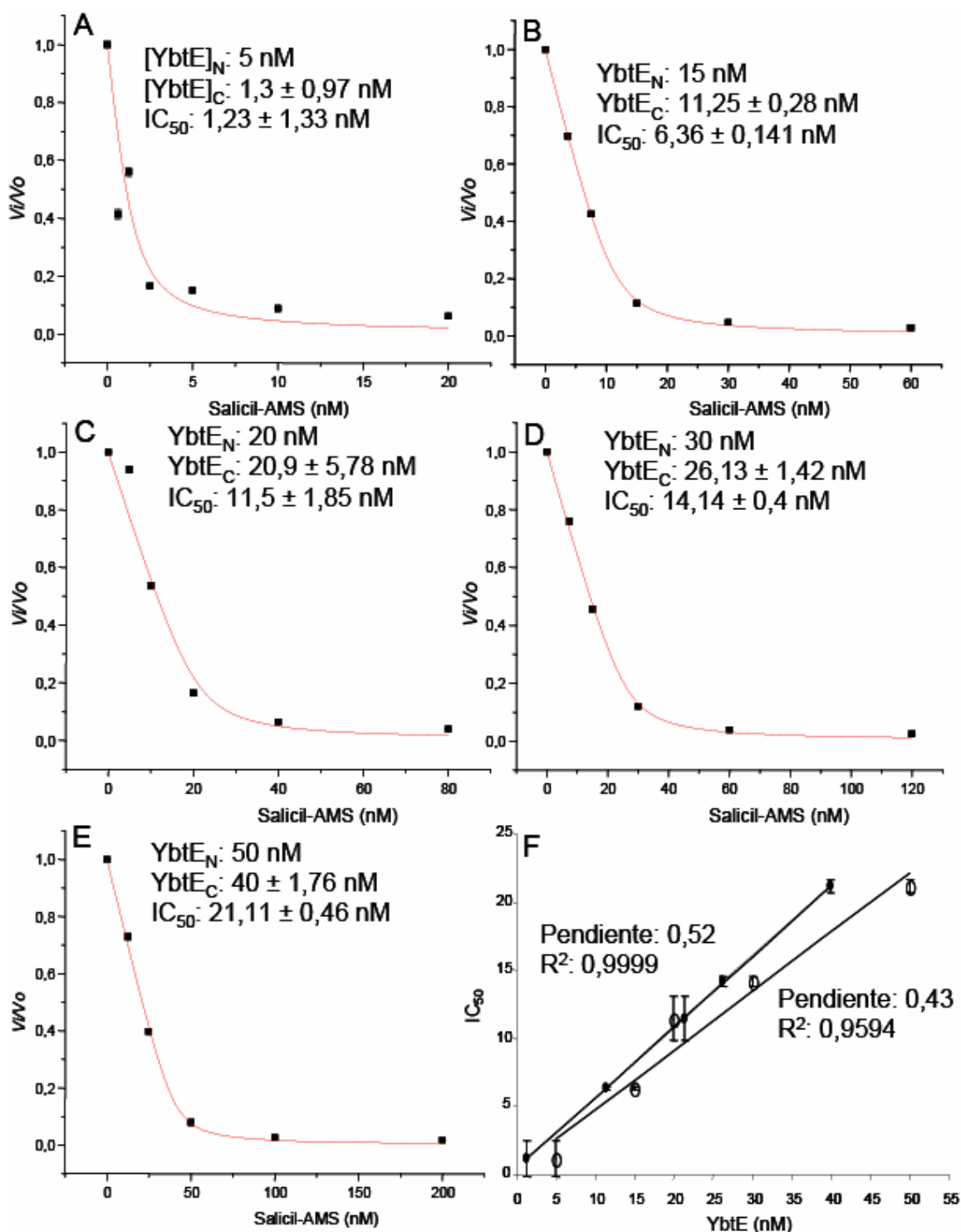


Figura 4.8: Inhibición de adenilación a diferentes concentraciones de enzima. En las curvas A-E, la fraccional de la velocidad esta graficada como función de la concentración de salicil-AMS. V_i y V_c representan la velocidad en presencia de salicil-AMS y DMSO respectivamente. $YbtE_N$ es la concentración de YbtE nominal y $YbtE_C$ es la concentración de enzima calculada por la ecuación de Morrison. En el gráfico F los valores de IC_{50} obtenidos se graficaron en contra de la concentración de enzima nominal (círculos vacíos) y calculada (círculos llenos). Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

Uno de los métodos para determinar la modalidad de inhibición es a través del análisis del comportamiento del K_i^{ap} calculado a partir de ensayos de concentración-respuestas a diferentes concentraciones de sustrato.

El K_i^{ap} varía dependiendo de la modalidad de inhibición (Copeland, 2000), generando gráficos diferentes cuando los valores K_i^{ap} se grafican en función de la concentración de sustrato como se puede deducir en las siguientes ecuaciones que describen estas relaciones:

-para inhibidores de unión competitivos

$$K_i^{ap} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$$

por lo que el K_i^{ap} aumentará con el incremento de la concentración del sustrato y el valor K_i verdadero se puede calcular como la intercepción de la línea ajustada con el eje y.

En cambio

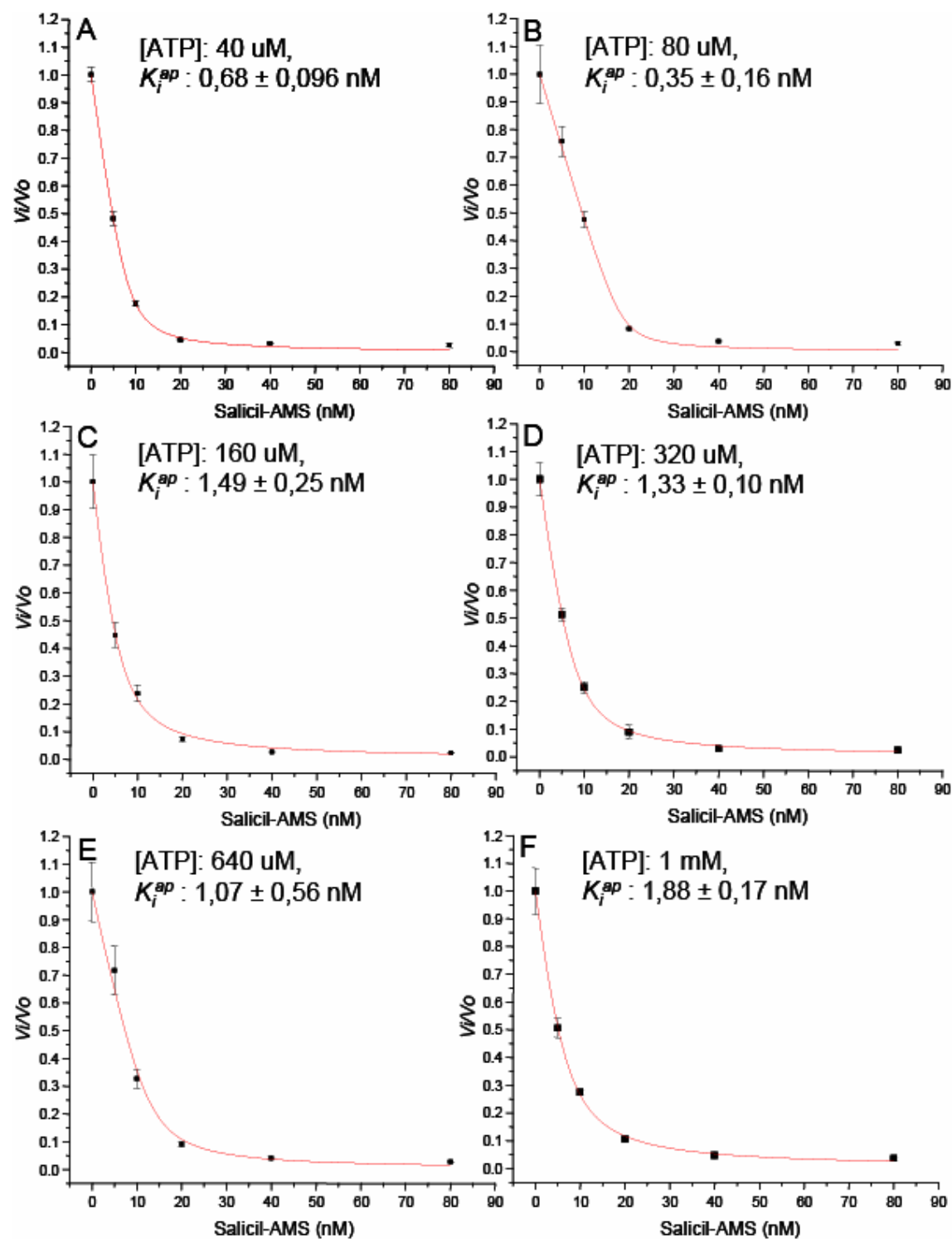
-para los inhibidores de unión fuerte no competitivos

$$K_i^{ap} = K_i$$

ya que el K_i^{ap} es independiente de la concentración de sustrato, por lo que el K_i real es calculado promediando todos los valores de K_i^{ap} obtenidos.

La determinación del K_i^{ap} en curvas de concentración-respuesta manteniendo fija la concentración de enzima y uno de los dos sustratos de YbtE mientras se varía el otro, nos permitió determinar la modalidad de inhibición y el K_i real para ambos sustratos: ácido salicílico y ATP.

Para esto se realizaron dos series de ensayos. En el primero de ellos (figura 4.9 A-H) mantuvimos la concentración de ácido salicílico en 1 mM y variamos la concentración de ATP de 0 a 10 mM. En la segunda serie (figura 4.10 A-G) mantuvimos la concentración de ATP en 10 mM y variamos la concentración de ácido salicílico de 0 a 250 μ M. El gráfico de los valores de K_i^{ap} para el ATP sobre un rango de concentración de



Continúa en la siguiente página...

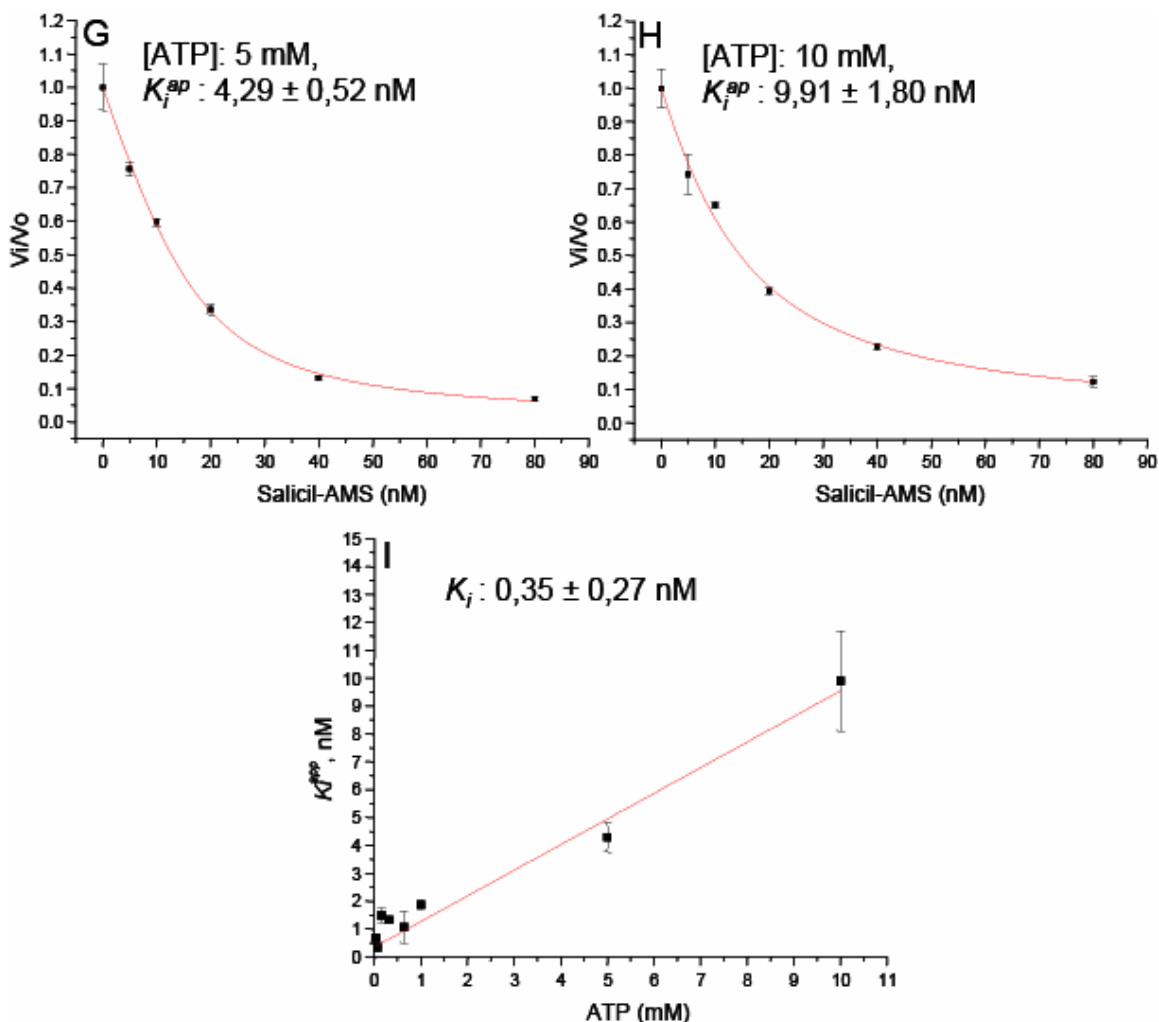
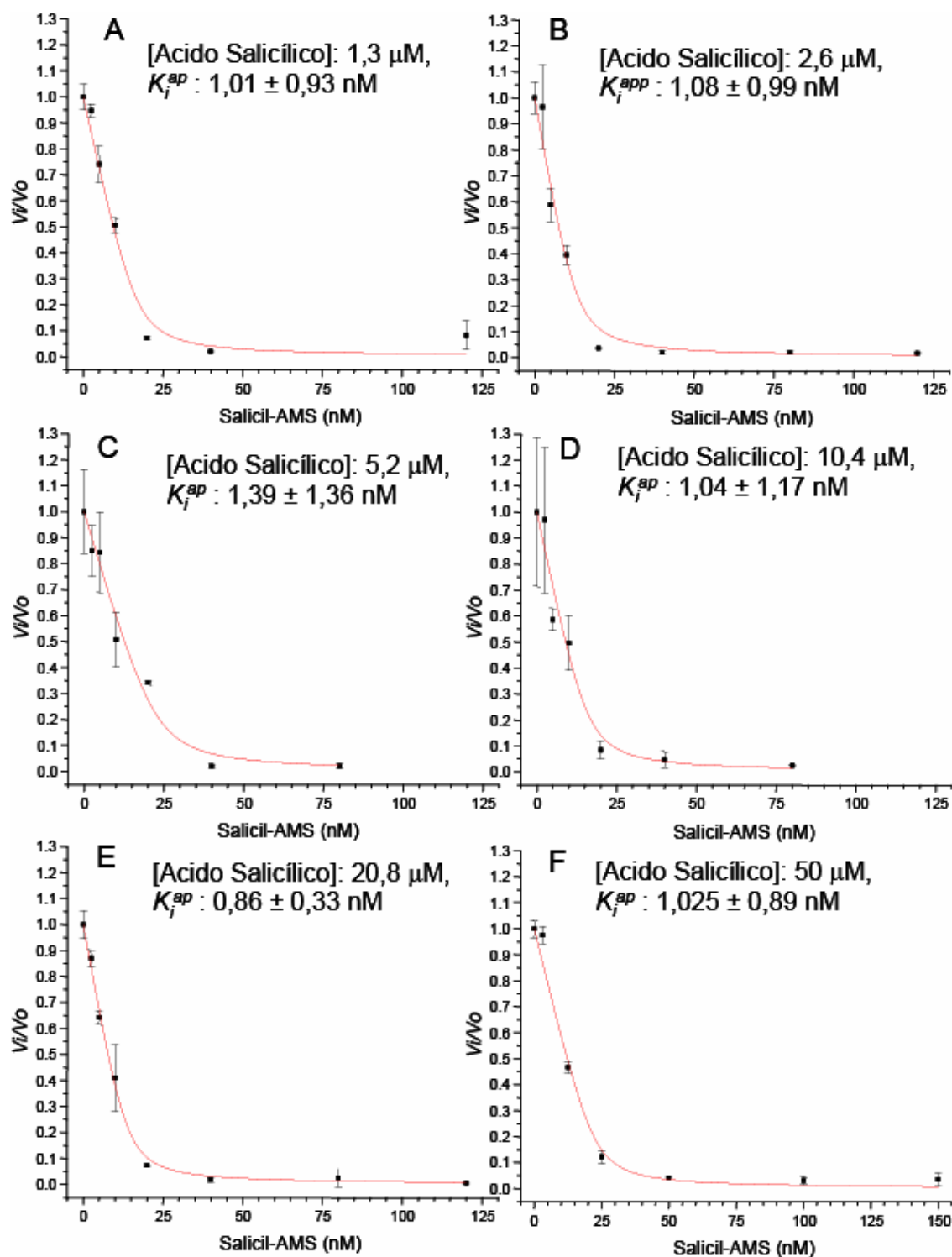


Figura 4.9: Inhibición de la adenilación a diferentes concentraciones de ATP. En las curvas A-H, la fraccional de la velocidad esta graficada como función de la concentración de salicil-AMS variando la concentración de ATP en cada curva. V_i y V_o representan la velocidad en presencia de salicil-AMS y DMSO respectivamente. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. En la curva I, los valores de K_i^{ap} están graficados en contra de la concentración de ATP.

sustrato de 0,2 a 60 veces la K_m^{ATP} (figura 4.9 I), muestra un incremento lineal característico de un inhibidor competitivo, obteniéndose un K_i (constante de inhibición) de $0,35 \pm 0,27$ nM, calculado como el punto de intersección del eje y con la recta obtenida del ajuste de los datos. Por otro lado, el gráfico de los valores de K_i^{ap} a concentraciones variables de ácido salicílico en un rango de 0,2 a 50 veces la K_m^{Sal} (Figura 4.10 H), mostró que esta constante es independiente de este sustrato, característico de un

inhibidor no competitivo. El K_i calculado en estas condiciones fue de $1,08 \pm 0,98$ nM, obtenido al promediar los valores de K_i^{ap} de cada curva de dosis respuesta.



Continúa en la siguiente página...

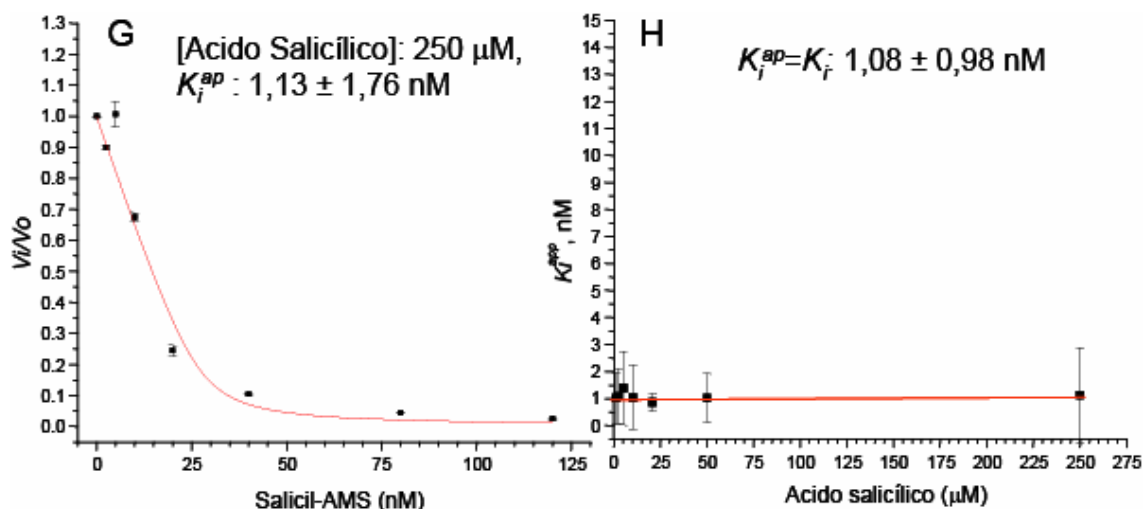


Figura 4.10: Inhibición de la adenilación a diferentes concentraciones de ácido salicílico. En las curvas A-G, la fracción de la velocidad está graficada como función de la concentración de salicil-AMS variando la concentración de ATP en cada curva. V_i y V_o representan la velocidad en presencia de salicil-AMS y DMSO respectivamente. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. En la curva H, los valores de K_i^{ap} están graficados en contra de la concentración de ATP. El K_i está calculado promedio de todos los K_i^{ap} obtenidos.

4.3.2 Ensayo de salicilación en placas multipocillos

Con los ensayos de intercambio [32 P]PPi-ATP se demostró que el compuesto salicil-AMS inhibe la primera parte de la reacción de salicilación llevada a cabo por las enzimas YbtE, MbtA y PchD. Esto significaría por lo tanto, que la segunda parte de la reacción, donde el ácido salicílico es transferido al dominio ArCP, debería estar bloqueada de la misma manera.

Para probar esta idea, desarrollamos un ensayo de salicilación del dominio ArCP de la enzima HMWP2 por la enzima YbtE, en placas multipocillos FlashPlate. Estas placas usan la tecnología de centelleo por proximidad o SPA (por sus siglas en inglés Scintillation Proximity Assay).

La tecnología SPA se basa en que cuando un radio-isótopo decae, libera partículas subatómicas (partículas α) que solo recorren una distancia limitada, la cual depende de la energía que posea dicha partícula. Si la distancia del átomo emisor con respecto al compuesto de centelleo es mayor que la distancia de recorrido de las partículas α , el compuesto de centelleo no será estimulado y de esa manera no se producirá señal.

Como se muestra en la figura 4.11, los pocillos de las placas FlashPlate® PLUS poseen una cubierta cintilante que solo será estimulada si el compuesto radioactivo esta lo suficientemente cerca de las paredes o del fondo del pocillo. Además, estos pocillos poseen una cubierta de Ni^{2+} que permite unir proteínas que posean una cola de histidinas. Así, en nuestros ensayos solo las moléculas de $[\text{}^3\text{H}]$ -ácido salicílico incorporados por la enzima YbtE a los dominios holo-*yp*ArCP-6H previamente cargado a los pocillos, estarán a una distancia capaz de estimular al compuesto de centelleo y producir señal.

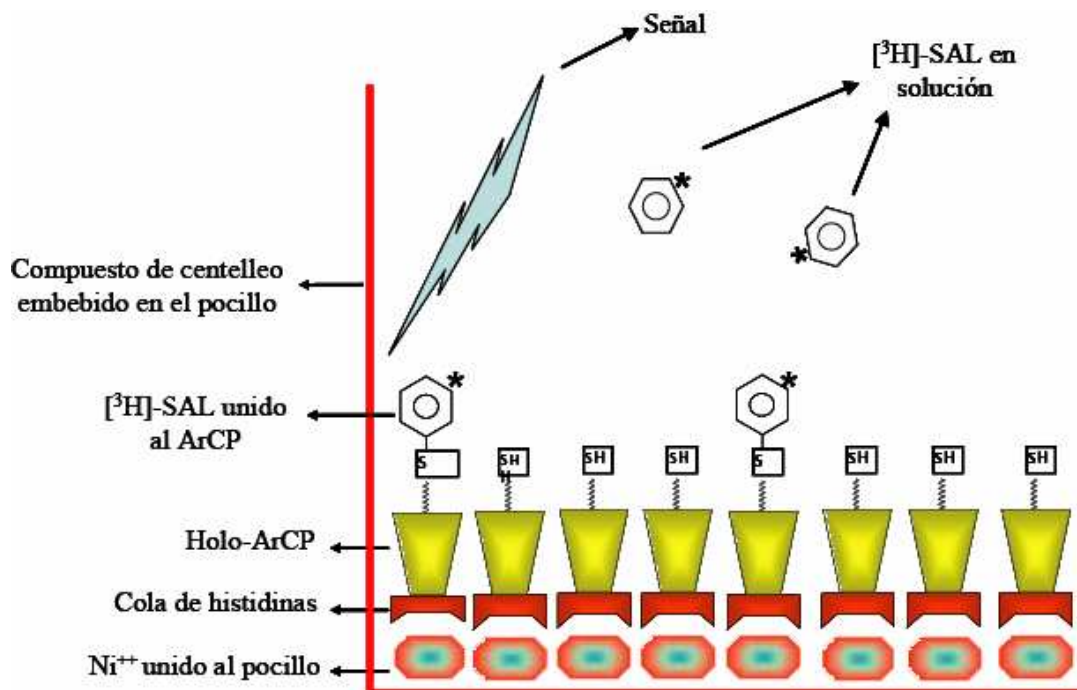


Figura 4.11: Esquema del ensayo de salicilación de placas multipocillos FlashPlate. $[\text{}^3\text{H}]$ -SAL: $[\text{}^3\text{H}]$ -ácido salicílico.

Si bien las condiciones de salicilación ya han sido descritas con anterioridad, este ensayo en placas multipocillos presenta ciertas características particulares que obligan a optimizar las condiciones nuevamente. Entre estas características particulares se destacan el hecho de que uno de los componentes de la reacción, el dominio ArCP, se encuentra inmóvil y no en solución, y que a su vez, hay un límite en la concentración efectiva del mismo que se puede agregar en la reacción debido a la capacidad de unión del pocillo. Esta limitada cantidad de dominios ArCP disponibles para ser cargados hace necesario una alta sensibilidad en el ensayo. Para ello decidimos que todo el ácido salicílico usado

en la reacción esté marcado con tritio, de manera de que todo el sustrato que se incorpora genere una señal. Pero, por otro lado, la concentración final de [^3H]-ácido salicílico no puede ser excesivamente alta, ya que una elevada actividad específica en la reacción nos puede incrementar la señal de fondo por un efecto de localización aleatoria de moléculas libres cerca de las paredes del pocillo.

4.3.2.1 Optimización de las condiciones de reacción de salicilación en placas multipocillos

El primer paso en el desarrollo del ensayo fue comprobar que la señal producida en las placas era proporcional al *ypArCP* salicilado y unido al pocillo. El siguiente paso fue ajustar las condiciones de reacción como el pH, concentración de cloruro de sodio, glicerol, MgCl_2 y DMSO, así como la determinación de la concentración de enzima a utilizar y el tiempo de reacción, de manera de obtener el mejor rango dinámico entre máxima señal y la señal base.

Como en principio no hay un orden preestablecido que diga por donde empezar a optimizar la reacción, ya que la modificación de un factor puede afectar la influencia que otro factor pueda tener en la reacción, nuestro esquema de optimización se realizó de manera tal que cada componente fue analizado en forma individual y, una vez elegida la mejor condición para ese factor, esa condición se usó en la optimización del siguiente componente de la reacción. Al final, luego de que todos los componentes fueron ajustados, algunos ensayos de optimización realizados al comienzo del proceso se repitieron de manera de confirmar o cambiar las condiciones establecidas en ese momento.

Dependiendo del ensayo, las reacciones se cargaron en los pocillos, donde previamente *ypArCP*-6H ya había sido unido, en uno, dos o tres pasos. En el primer caso se preparó una mezcla maestra con todos los componentes comunes, excepto el componente de la reacción a ajustar, el cual se agregaba a la concentración deseada en mezclas que se preparaban a partir de la primera mezcla maestra. La reacción comenzaba cuando 50 μl de estas sub-mezclas eran agregadas al correspondiente pocillo. En el cargado en dos pasos, se dispensó en cada pocillo, 30 μl de una mezcla maestra que contenía todos los componentes excepto la enzima, la cual se agregó posteriormente (20

μl) para comenzar la reacción. De esta manera se logra que la enzima se encuentre en el mismo momento con los sustratos naturales y el inhibidor a ensayar. La preparación de la reacción en tres pasos fue pensada para los ensayos de búsquedas de inhibidores a gran escala. A diferencia de la reacción en dos pasos, el [³H]-ácido salicílico es agregado en forma individual (5 μl) luego de agregar la mezcla maestra (25 μl). Este paso extra se realizó para evitar la contaminación con radioactividad del sistema automatizado que se usa para dispensar los compuestos a probar en un ensayo a gran escala.

Todos los ensayos se pararon de la misma manera, agregando 300 μl de tampón PBS con 1 mM de ácido salicílico y lavando el pocillo 1 vez más con la misma solución. Antes de leer, esta solución de lavado se aspiraba.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el proceso de optimización de la reacción de salicilación por YbtE en las placas multipocillos FlashPlate agrupados por componentes de la reacción. La forma de preparar la reacción se describe al pie de cada figura. Todas las reacciones se incubaron a 37°C.

Proporcionalidad de la señal: Para esta determinación realizamos una serie de ensayos de competición donde la reacción de salicilación fue hecha en solución para obtener el mayor porcentaje posible de incorporación de ácido salicílico al dominio ArCP y luego, el dominio salicilado, se procedió a incubarlo en las placas multipocillos FlashPlate con cantidades crecientes de dominios sin modificar y por lo tanto, incapaces de dar señal. Este ensayo de competición mostró que a medida que se incrementaba la concentración del dominio no salicilado, la señal disminuía en forma lineal cuando se graficaba en escala logarítmica (Figura 4.12).

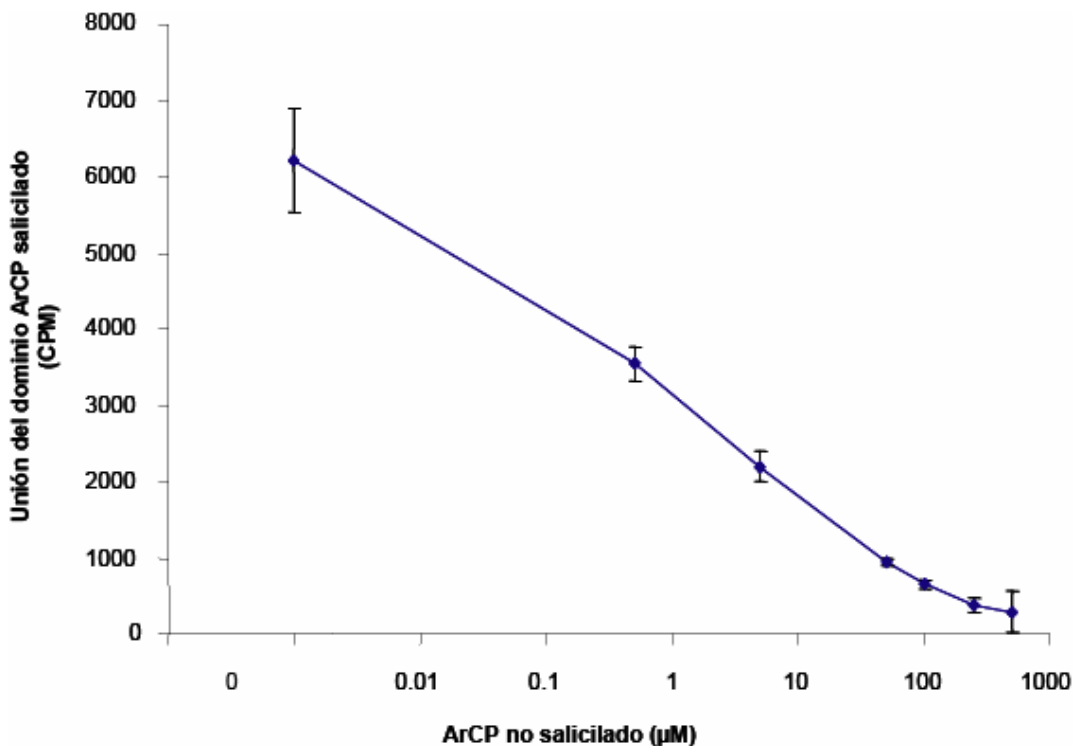


Figura 4.12: Ensayo de competición de unión al pocillo de las placas multipocillos FlashPlate entre dominios *yp*ArCP-H6 previamente salicilados con [3 H]-ácido salicílico y dominios holo-*yp*ArCP-H6 no salicilados. La unión del dominio salicilado se graficó en función del logaritmo de la concentración en μ M de ArCP no salicilado. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. CPM: cuentas por minuto.

Concentración de enzima: El primer paso fue elegir una concentración de enzima que nos diera una señal suficiente a partir de la cual pudiéramos optimizar la reacción. La misma fue realizada variando la concentración de YbtE de 30,6 nM a 1 μ M a un tiempo fijo de 2 horas. Como se observa en la figura 4.13, aún con la concentración más baja de YbtE se puede observar una actividad que incrementa proporcionalmente con el aumento de la concentración de enzima. Como en los ensayos de búsqueda de inhibidores de la reacción es conveniente usar concentraciones de enzima más bien bajas, decidimos utilizar de aquí en adelante una concentración de YbtE de entre 30 y 60 nM para los siguientes experimentos de optimización.

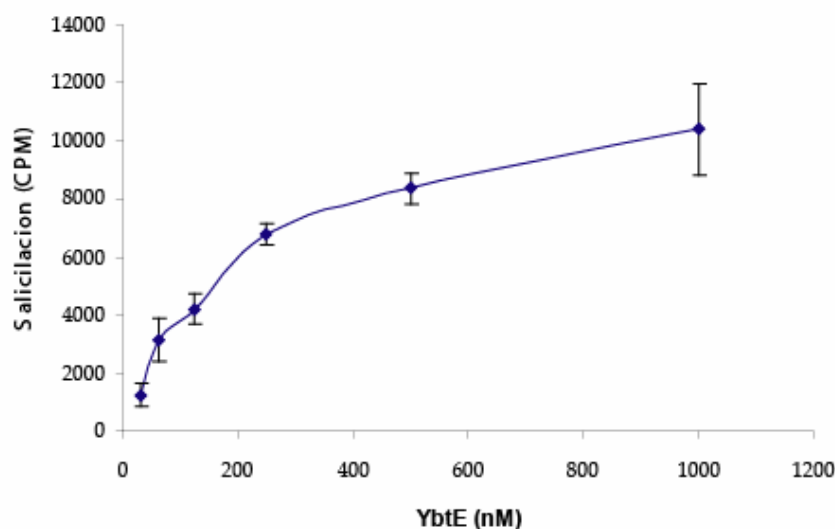


Figura 4.13: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate a diferentes concentraciones de enzima (YbtE). Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, 150 nM [3H]-ácido salicílico y la correspondiente concentración de enzima fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 2 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas CPM: cuentas por minuto.

Efecto del pH y la fuerza iónica: En el ensayo anterior para la determinación de la concentración de enzima a utilizar, se usó tampón Tris-HCl pH 7,5, por lo que, en primer lugar, decidimos probar si un tampón fosfato como PBS a un pH similar (7,4), podría tener algún efecto positivo en la reacción. En un ensayo realizado lado a lado con ambos tampones y con dos concentraciones de enzima (30 y 60 nM), pudimos ver que el tampón PBS no aporta ninguna mejora en los niveles de señal (Figura 4.14).

En un experimento posterior analizamos el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio a diferentes pHs. Las concentraciones de cloruro de sodio fueron desde 0 a 300 mM y los rangos de pHs desde 4,5 a 8,5. A diferencia del experimento anterior, además del cambio en el pH y en la concentración salina, las reacciones fueron suplementadas con 5% de glicerol (ver optimización de la concentración de glicerol).

Como se observa en la figura 4.15, el incremento en la concentración salina en la reacción tiene un efecto negativo independientemente del pH al que se haya llevado acabo la misma, obteniéndose la mayor señal en las reacciones sin cloruro de sodio.

Por su parte, el tampón HEPES a pH 7,0 resultó ser el más adecuado, mostrando una mayor señal cuando se compara con los otros tampones utilizados a la misma concentración de cloruro de sodio (figura 4.15).

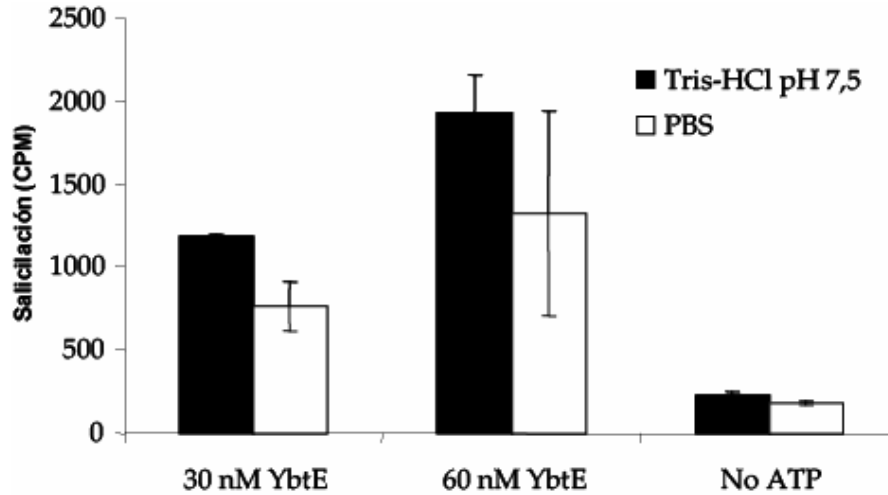


Figura 4.14: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para comparar los tampones Tris-Cl pH 7,5 y PBS pH 7,4. Reacciones de 50 μ l conteniendo o 75 mM Tris-Cl pH 7,5 o PBS, 10 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, 150 nM [3H]-ácido salicílico y la correspondiente concentración de enzima (30 o 60 nM) fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 2 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-*ypArCP-H6* se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas CPM: cuentas por minuto.

Una vez que los componentes de la reacción fueron optimizados, volvimos a evaluar el efecto del pH sobre la reacción, realizando un ensayo en paralelo entre el tampón HEPES a pH 7,0 y el tampón MES a pH 6,5. A diferencia que el primer ensayo a diferentes pHs, el uso del tampón MES a pH 6,5 resultó en una actividad levemente superior, seleccionándose este tampón para los futuros ensayos (Figura 4.16).

Concentración de glicerol: Como el glicerol es conocido por ayudar a la estabilidad de las enzimas y su uso en la reacción podría ayudar a mantener la actividad de YbtE en incubaciones más prolongadas, decidimos evaluar su utilización. Para ello realizamos un ensayo en el que variamos la concentración de glicerol de 0 a 15 % e incubamos la reacción por 6 horas a 37°C. En la figura 4.17 vemos que con concentraciones del 5% de glicerol en la reacción obtenemos los mejores resultados.

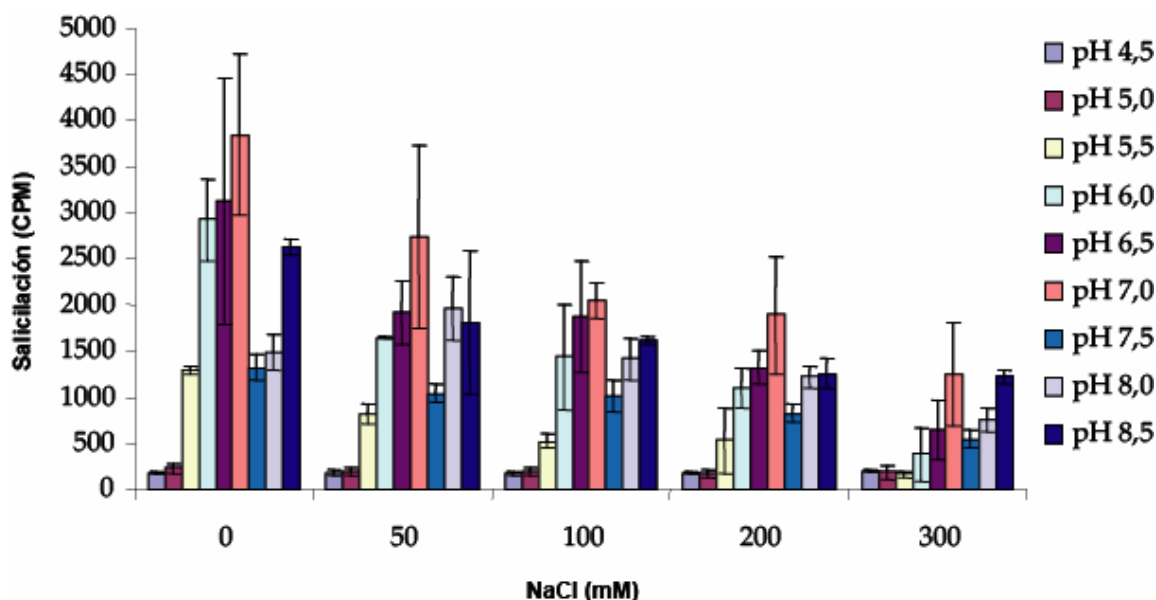


Figura 4.15: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar pH y concentración de cloruro de sodio. Reacciones de 50 μ l conteniendo uno de los tampones a 75 mM (tampón acetato pHs 4,5, 5,0 y 5,5. Tampón MES pHs 6,0 y 6,5. Tampón HEPES pH 7,0. Tampón Tris-Cl pHs 7,5, 8,0 y 8,5), 10 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, 150 nM [3H]-ácido salicílico, 5% glicerol y 60 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 2 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-*yp*ArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

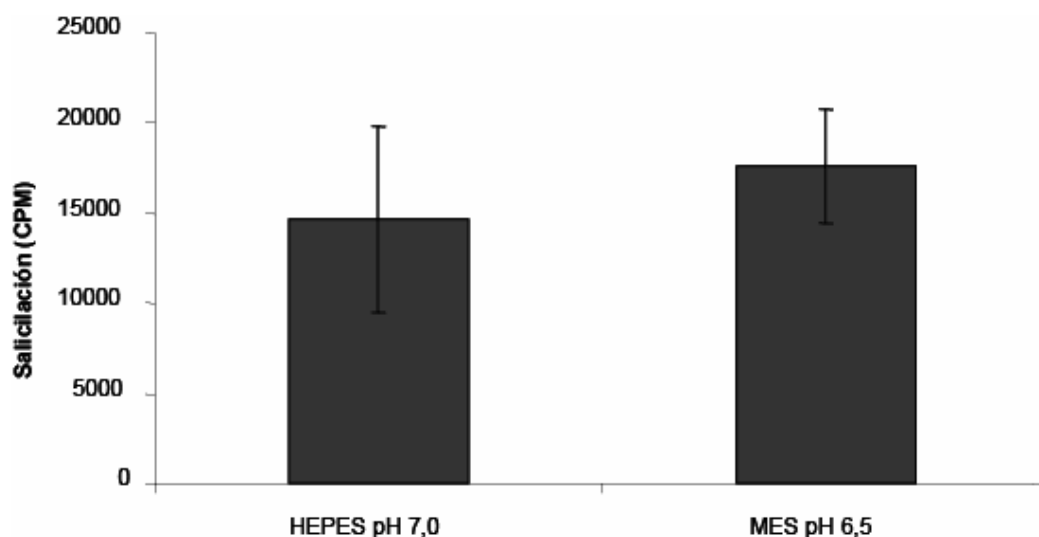


Figura 4.16: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para la optimización del pH. Reacciones de 50 μ l conteniendo uno de los tampones a 75 mM (HEPES pH 7,0 o MES pH 6,5), 50 μ M ATP, 150 nM [3H]-ácido salicílico, 5% glicerol, 4% DMSO y 30 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 2 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-*yp*ArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína y 0,75 mM DTT en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

De manera interesante, las reacciones sin glicerol mostraron una actividad muy reducida o nula, comparables con la señal obtenida en los controles negativos sin ATP. Si bien las razones de este efecto no son claras, tal vez podría deberse a que, en incubaciones largas, la frecuencia de hidrólisis del ácido salicílico cargado en el dominio ArCP no es compensada por la actividad enzimática que lo vuelve a cargar, que podría estar perdiendo su actividad a lo largo del tiempo. En este caso, el glicerol ayudaría a mantener la actividad de la enzima por más tiempo, contrarrestando de esta manera el efecto de la hidrólisis. El experimento se volvió a repetir en las mismas condiciones a fin de descartar problemas en la preparación de la reacción obteniéndose resultados similares (resultados no mostrados).

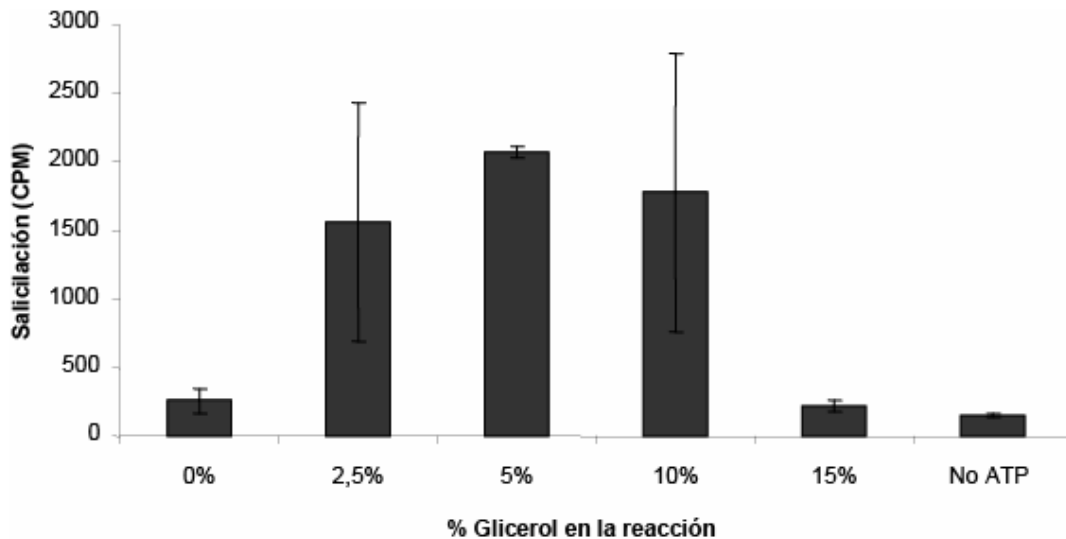


Figura 4.17: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de glicerol. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón Tris-Cl pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 100 μ M ATP, 150 nM [^3H]-ácido salicílico, de 0 a 15% glicerol y 60 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 6 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El control negativo sin ATP fue suplementado con 10% glicerol. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Concentración de cloruro de magnesio: Como el magnesio es fundamental en los ensayos de intercambio [^{32}P]PPi/ATP, fue otro de los componentes de la reacción que debía ajustar. Para ello llevamos a cabo reacciones enzimáticas donde las concentraciones de MgCl_2 se variaron de 0 a 10 mM en mezclas de reacción donde algunos de sus

componentes ya habían sido ajustados previamente como ser el tampón HEPES a pH 7, 5% glicerol y la no adición de NaCl.

Curiosamente, a pesar del requerimiento de magnesio que las enzimas de adenilación presentan (Airas, 1996; Airas, 2006), los mejores resultados se obtuvieron cuando el $MgCl_2$ no estuvo presente en la reacción (figura 4.18), por lo que se decidió no agregarlo en las futuras reacciones. Tal vez la presencia de pequeñas trazas contaminantes en otras sales o componentes de la mezcla de reacción fue suficiente para la actividad enzimática.

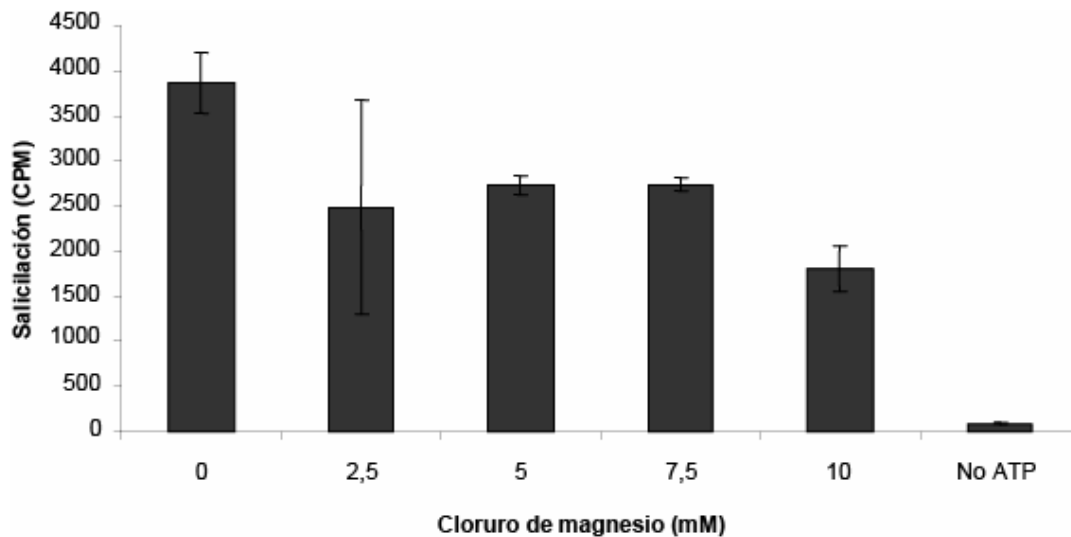


Figura 4.18: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de cloruro de magnesio. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón HEPES pH 7,0, de 0 a 10 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, 150 nM $[^3H]$ -ácido salicílico, 5% glicerol y 60 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 6 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El control negativo sin ATP fue suplementado con 10% glicerol. El cargado de la placa con holo-*ypArCP-H6* se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Concentración de ATP: Como el ATP es uno de los sustratos de la enzima, decidimos optimizar su concentración para una máxima señal. Para ello realizamos ensayos donde se fue variando la concentración de ATP, mientras que los demás componentes de la reacción se usaron según los resultados de sus optimizaciones previas.

En el primer ensayo, la concentración de ATP varió de 0 a 1 mM, mientras que la mezcla de reacción contenía el tampón HEPES a pH 7 y 5% glicerol (Figura 4.19). En

este caso, si bien las diferencias no fueron muy marcadas, la menor concentración (50 μ M) dio la mejor respuesta.

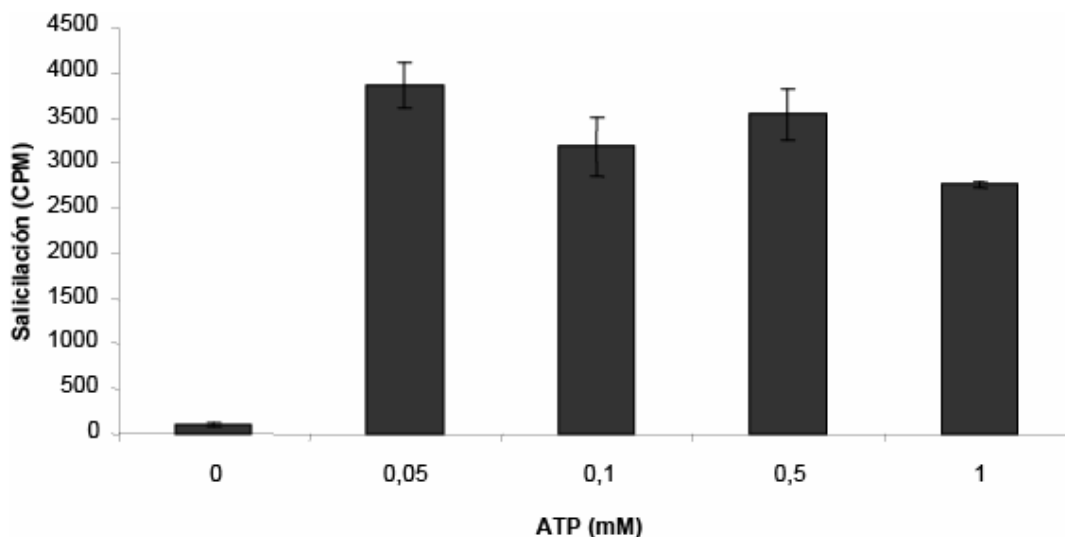


Figura 4.19: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de ATP. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón HEPES pH 7,0, de 0 a 1 mM ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol y 60 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 6 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-*yp*ArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Luego de optimizar otros componentes de la reacción, realizamos otro ensayo donde el tampón usado fue MES pH 6,5 y además de glicerol, la reacción contaba con 1 mM TCEP y 4% DMSO, obteniéndose la máxima señal cuando usamos 100 μ M de ATP (Figura 4.20).

Concentración de DMSO: Como generalmente los compuestos a ser probados en la búsqueda de inhibidores a gran escala o como en el caso del compuesto salicil-AMS, están disueltos en DMSO, otro factor a tener en cuenta fue el efecto que este podría tener en el desarrollo de la reacción. Para probar esto, hicimos una serie de reacciones en la que se varió la concentración de DMSO en la reacción de 0 a un 10% del volumen final. Como se observa en la figura 4.21, si bien el DMSO ejerce en general un efecto negativo comparado con la reacción control sin DMSO, la reducción en la señal no es lo suficientemente importante hasta una concentración del 5%, dándonos así un amplio margen de trabajo sin que se llegue a comprometer el desarrollo de la reacción.

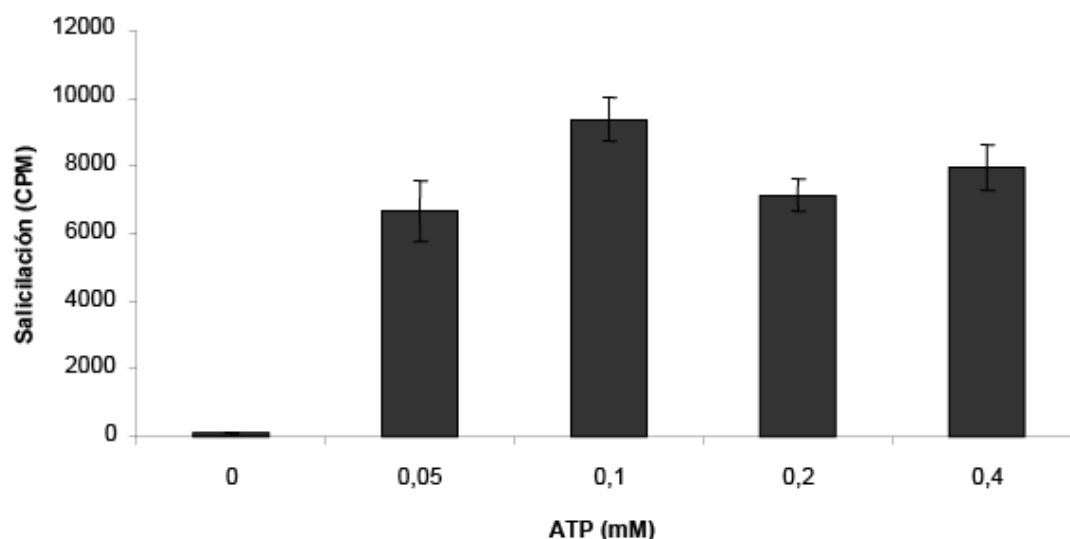


Figura 4.20: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de ATP. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón MES pH 6,5, de 0 a 0,4 mM ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol, 1 mM TCEP, 4% DMSO y 30 nM YbtE fueron dispensadas en 3 pasos en cada pocillo e incubadas por 1,5 horas a 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

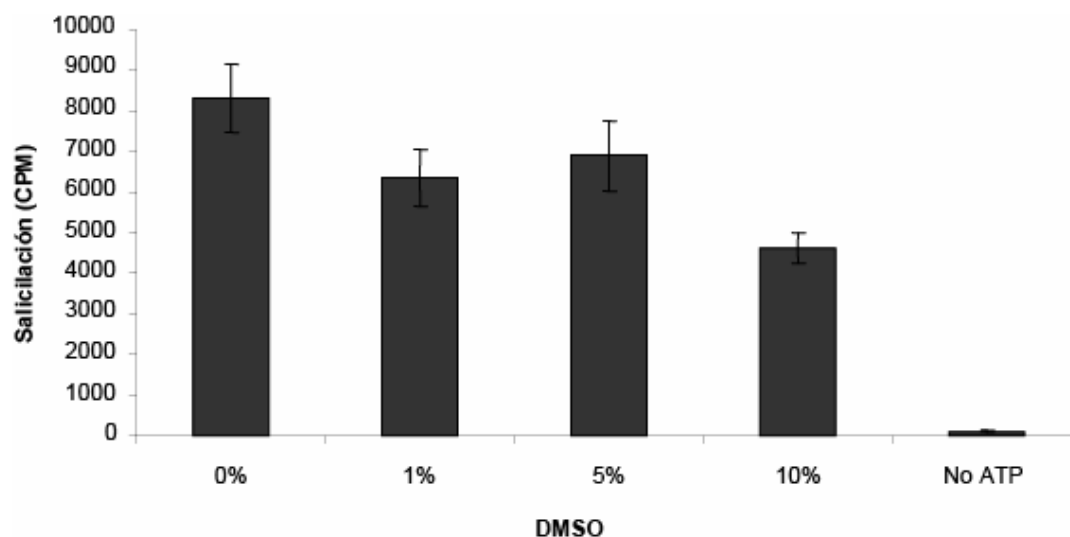


Figura 4.21: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar concentración de DMSO. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón MES pH 6,5, de 0 a 0,4 mM ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol, 1 mM TCEP, 4% DMSO y 30 nM YbtE fueron dispensadas en 1 paso en cada pocillo e incubadas por 1,5 horas a 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Tiempo de reacción: En este ensayo, las concentraciones de YbtE variaron de 15 a 180 nM, y las reacciones se pararon a intervalos de tiempos regulares. Como se observa en la figura 4.22, a todas la concentraciones de enzima analizadas hay un incremento lineal en la señal hasta las 4 horas de incubación, después del cual la velocidad de reacción disminuye.

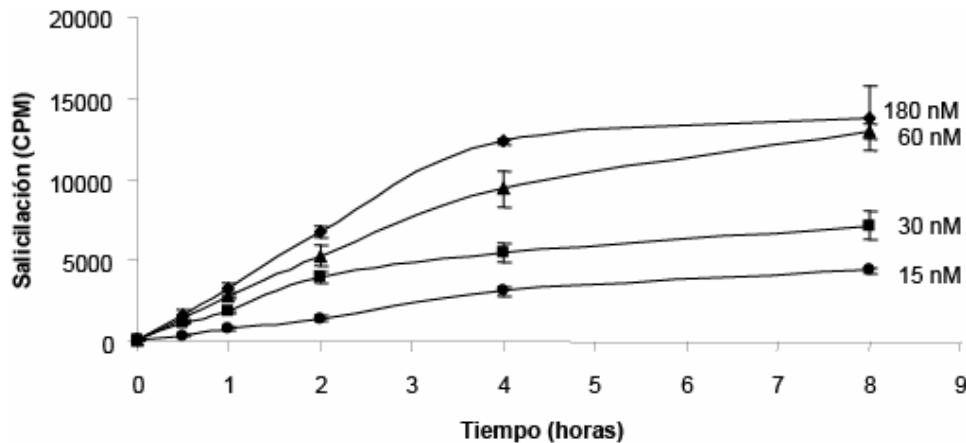


Figura 4.22: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de enzima. Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón HEPES pH 7,0, 50 μ M ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol y de 15 a 180 nM YbtE (indicadas al final de cada curva) fueron dispensadas en 1 paso en cada pocillo e incubadas a diferentes tiempos a 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Unión del dominio ArCP al FlashPlate: Para gran parte de los ensayos de optimización, el cargado de los pocillos del FlashPlate con la proteína ypArCP previamente purificada y modificada con el grupo 4'PP, se realizó incubando la proteína en 50 μ l de tampón PBS a una concentración de 6 μ M por 48 horas a 4°C, y luego lavando el pocillo con PBS para remover proteínas no unidas. Como el extremo libre del grupo 4'PP termina con un grupo -SH, existe la posibilidad de que se formen enlaces bisulfuros entre dos moléculas de proteína, evitando así que estén disponibles para ser salicilados durante la reacción. Para evitar esto, decidimos evaluar si la incubación de la proteína con un agente reductor durante la unión al pocillo, resultaría en un incremento en la señal durante la reacción.

En el ensayo se probaron dos cosas. Por un lado se desarrolló la incubación de la

proteína holo-ypArCP-6H de la misma manera que se describió anteriormente y luego del lavado de los pocillos, estos se incubaron por otras 5 horas a temperatura ambiente con 300 μ l de tampón PBS y distintas concentraciones del agente reductor DTT que variaron de 0 a 1 mM (condición 1). En el mismo ensayo, otro grupo de pocillos fueron incubados de la misma manera, pero el DTT se agregó desde un comienzo junto con la proteína (condición 2). Como se observa en la figura 4.23, el agregado de DTT mejora considerablemente los niveles de la señal, no habiendo diferencias importantes si el DTT se agrega durante la incubación del dominio o después del mismo, excepto cuando la concentración del agente reductor es de 100 μ M, donde el agregado del mismo junto con la proteína, no muestra ninguna mejora con respecto a los controles sin DTT.

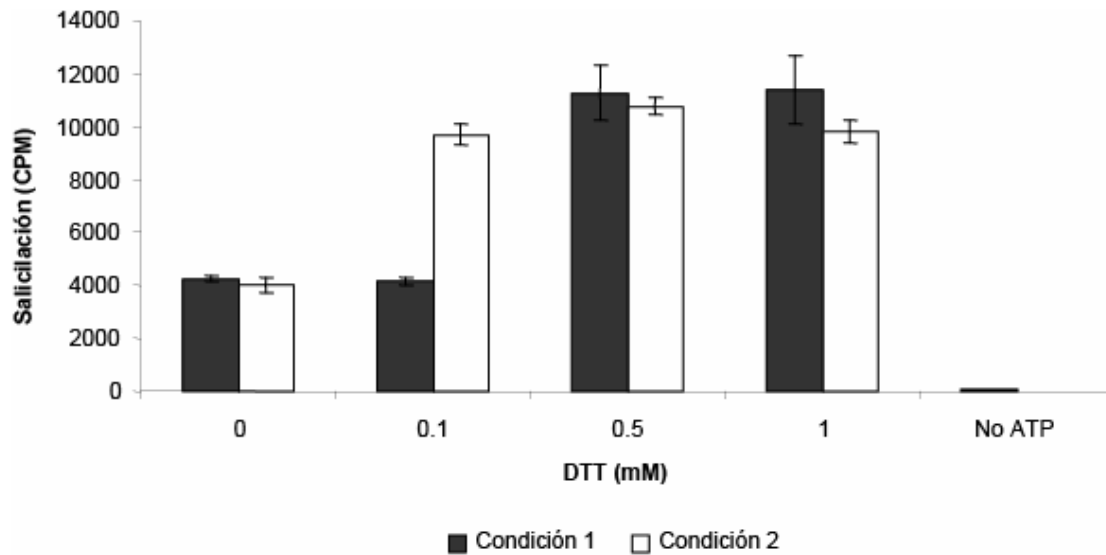


Figura 4.23: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para optimizar el cargado de la placa FlashPlate con holo-ypArCP-H6. Condición 1: Unión del dominio ArCP con DTT incluido en la solución. Condición 2: Unión del dominio ArCP sin DTT en la solución y posterior incubación con tampón PBS con DTT (ver texto). Reacciones de 50 μ l conteniendo 75 mM tampón HEPES pH 7,0, 50 μ M ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol y 100 nM YbtE fueron dispensadas en 1 paso en cada pocillo e incubadas a 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. CPM: cuentas por minuto.

Uso de un agente reductor durante la reacción: Debido al efecto positivo del uso de DTT durante la incubación para la unión del dominio ArCP a los pocillos, decidimos evaluar el efecto de un agente reductor agregado en la mezcla de reacción. Para ello decidimos utilizar TCEP en vez de DTT, debido a que el primero presenta las ventajas con respecto al segundo, de ser más estable y reducir en forma más eficiente y rápida los

enlaces bisulfuros. Las reacciones se llevaron a cabo en tampones a pH 7 y 6,5 y en presencia (1 mM TCEP) y ausencia de TCEP. La figura 4.24 muestra por un lado lo que ya habíamos observado antes sobre el efecto del pH en la reacción, siendo el pH más ácido más favorable, y por el otro, que el agregado del agente reductor ejerce un efecto moderadamente positivo en los niveles de señal.

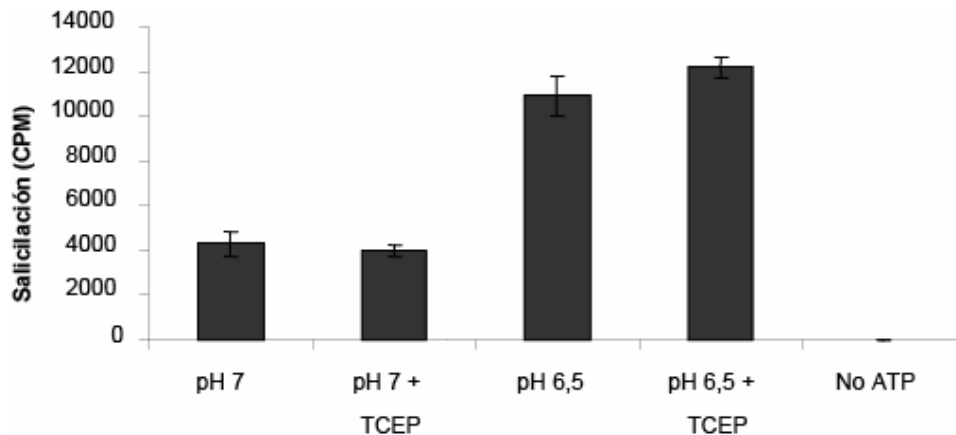


Figura 4.24: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate para la optimización de TCEP. Reacciones de 50 μ l conteniendo uno de los tampones a 75 mM (HEPES pH 7,0 o MES pH 6,5), 50 μ M ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol y 30 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas por 2 horas 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-ypArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína y 0,75 mM DTT en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

Diseño final de la reacción: Considerando todos los ensayos de optimización, concluimos que las mejores condiciones para los ensayos de salicilación eran realizar la reacción en 75 mM tampón MES pH 6,5, 5% glicerol, 100 mM ATP, 1 mM TCEP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico y 30 nM de enzima YbtE. Para la unión del dominio holo-ypArCP-6H a los pocillos, se estableció una incubación de 48 horas de 6 μ M holo-ypArCP-6H en tampón PBS a 4°C y en presencia de 0,75 mM DTT debido a que entre los resultados de los ensayos a las concentraciones de DTT a 0,5 y 1 mM no hay diferencias y a que una concentración de 1 mM esta en el límite superior de la concentración tolerada por los pocillos de FlashPlate.

Al final del proceso de optimización de la reacción, realizamos otro ensayo donde usamos 30 nM de la enzima YbtE y paramos la reacción a tiempos regulares. En la figura

4.25 podemos observar que hay un incremento lineal de la señal hasta las dos horas a partir de la cual, ésta se mantiene constante.

El ensayo en estas condiciones permitió aumentar considerablemente el rango dinámico del ensayo cuando este se compara con los ensayos realizados al comienzo del proceso de optimización.

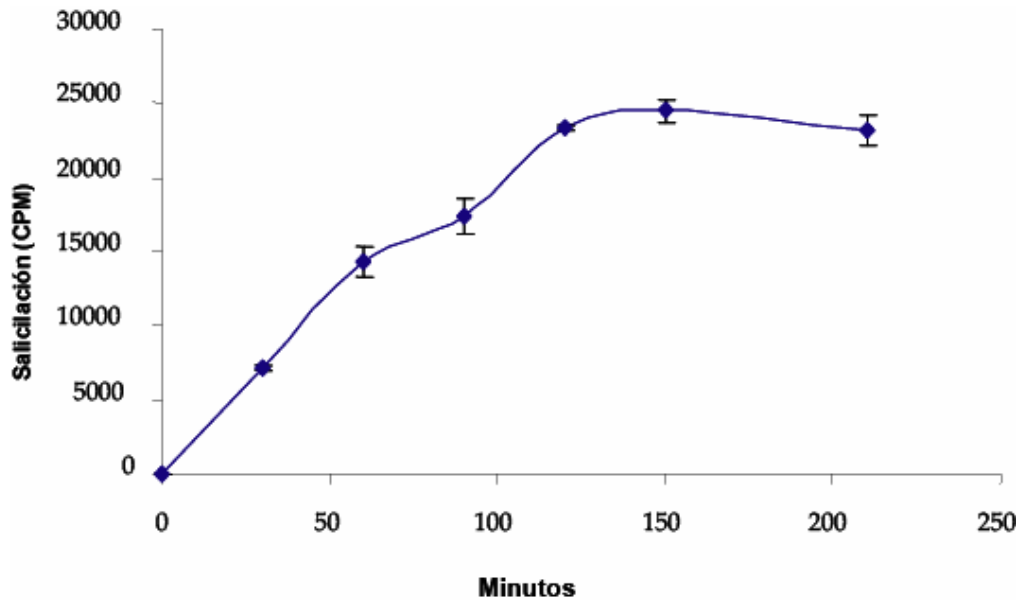


Figura 4.25: Reacción de salicilación en placas multipocillos FlashPlate optimizada a diferentes tiempos. Reacciones de 50 μ l conteniendo tampón 75 mM MES pH 6,5, 100 μ M ATP, 150 nM [3 H]-ácido salicílico, 5% glicerol y 30 nM YbtE fueron dispensadas en un paso en cada pocillo e incubadas durante diferentes tiempos a 37°C. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar. El cargado de la placa con holo-*yp*ArCP-H6 se realizó incubando la misma con 50 μ l de una solución de 6 μ M de proteína y 0,75 mM DTT en tampón PBS a 4°C durante 48 horas. CPM: cuentas por minuto.

4.3.2.2 Ensayos de inhibición de la salicilación en placas multipocillos

Los ensayos de inhibición de la salicilación por salicil-AMS fueron realizados en las condiciones previamente ajustadas para la enzima YbtE en las placas multipocillos FlashPlate.

En concordancia con los datos obtenidos anteriormente con los ensayos de intercambio [32 P]PPi/ATP, salicil-AMS mostró un IC_{50} cercano a las concentraciones de enzima utilizada en el ensayo (figura 4.26 A-B). A diferencia de los ensayos de

adenilación, las diferencias entre las concentraciones de enzima nominales y calculadas usadas en estos ensayos, muestran una mayor diferencia, siendo los IC_{50} s calculados aproximadamente la mitad de la concentración de enzima calculada cuando se usó una concentración de enzima más alta: YbtE_N: 70 nM; YbtE_C: 93,51; IC_{50} : $47,87 \pm 2,39$ nM (Figura 4.26B), o un poco por debajo de la concentración calculada cuando usamos una concentración menor de enzima: YbtE_N: 30 nM; YbtE_C: 4,8; IC_{50} : $3,99 \pm 0,5$ nM (Figura 4.26A). Por el contrario, AMS probado hasta una concentración de 400 μ M no mostró un efecto inhibitorio sobre la reacción (datos no mostrados).

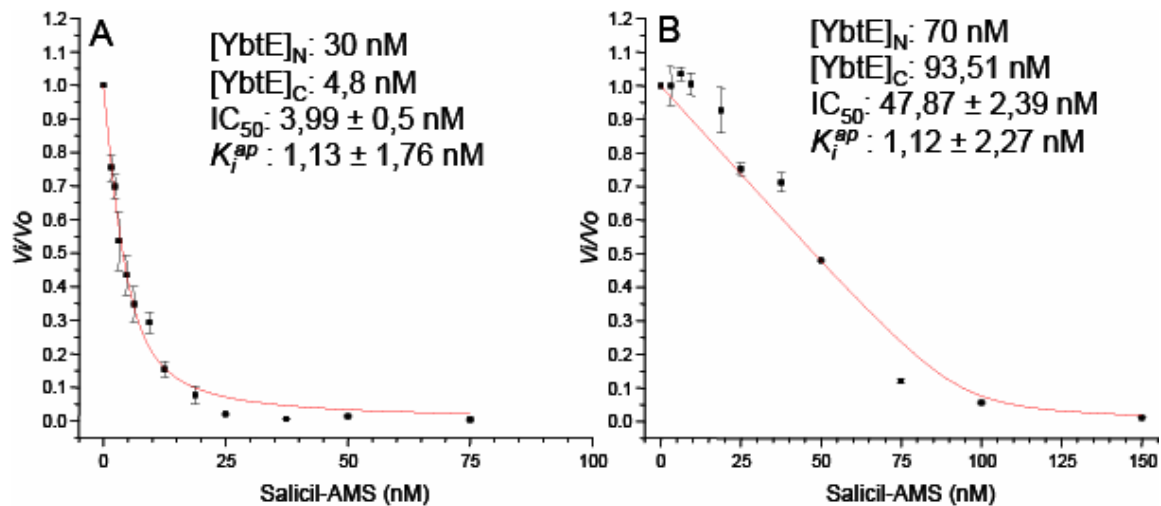


Figura 4.26: Inhibición de la salicilación a diferentes concentraciones de enzima. En las curvas A y B, la fraccional de la velocidad esta graficada como función de la concentración de salicil-AMS. V_i y V_o representan la velocidad en presencia de salicil-AMS y DMSO respectivamente. YbtE_N es la concentración de YbtE nominal y YbtE_C es la concentración de enzima calculada por la ecuación de Morrison. Cada punto fue analizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

4.4 Inhibición de la síntesis de sideróforos en cultivos bacterianos

Como el compuesto salicil-AMS mostró ser un potente inhibidor de la actividad enzimática tanto de YbtE como MbtA y PchD, decidimos probar si el mismo era capaz de inhibir la síntesis de los sideróforos correspondientes en cultivos celulares de *M. tuberculosis*, *Y. pestis* y *P. aeruginosa*.

En este estudio, las bacterias se crecieron en medio deficiente en hierro para inducir la síntesis de sideróforos. Para su detección, estos se marcaron agregando al

medio de cultivo [^{14}C]-ácido salicílico y, luego de su extracción, se analizaron por cromatografía en capa delgada (radio-TLC). Como tanto para *M. tuberculosis* como para *Y. pestis* los sideróforos a analizar eran, en principio, esenciales para su crecimiento en estas condiciones, el agregado del radioisótopo y el inhibidor se realizó una vez que los cultivos habían crecido y estaban sintetizando los sideróforos correspondientes en forma activa.

Estos ensayos mostraron que este compuesto fue capaz de inhibir la síntesis de sideróforo en *M. tuberculosis* (Figura 4.27 A y B) y *Y. pestis* (Figura 4.28 A), pero no en *P. aeruginosa* (Figuras 4.30).

En el caso de *M. tuberculosis*, las células fueron crecidas en medio Gast-D durante 8 días, colectadas y vueltas a resuspender en medio fresco Gast-D a una densidad óptica de 0,2. En este momento se agregó [^{14}C]-ácido salicílico y el inhibidor salicil-AMS (o DMSO en lugar de salicil-AMS como control), incubándolas por otros 3 días. Las micobactinas fueron extraídas tanto del medio de cultivo (micobactinas solubles) como de las células (micobactinas asociadas a membrana) y analizadas por radio-TLC. En los cultivos tratados solo con DMSO como control se pudieron observar tanto micobactinas solubles como asociadas a membranas pero fueron observadas prácticamente indetectables cuando los cultivos se trataron con salicil-AMS. El R_f (factor de retención) de las señales obtenidas (0,45 y 0,6) estuvieron de acuerdo a lo previamente reportado para estos sideróforos en el sistema de solventes utilizado en el ensayo (Barclay and Ratledge, 1988). Como control negativo de producción de micobactinas usamos una cepa de *M. tuberculosis* incapaz de producirlas por una disrupción del gen *mbtF* necesario para su síntesis. Como se esperaba, esta cepa no mostró ninguna síntesis ni de micobactinas solubles ni de micobactinas asociadas a membrana (Figura 4.27 A y B).

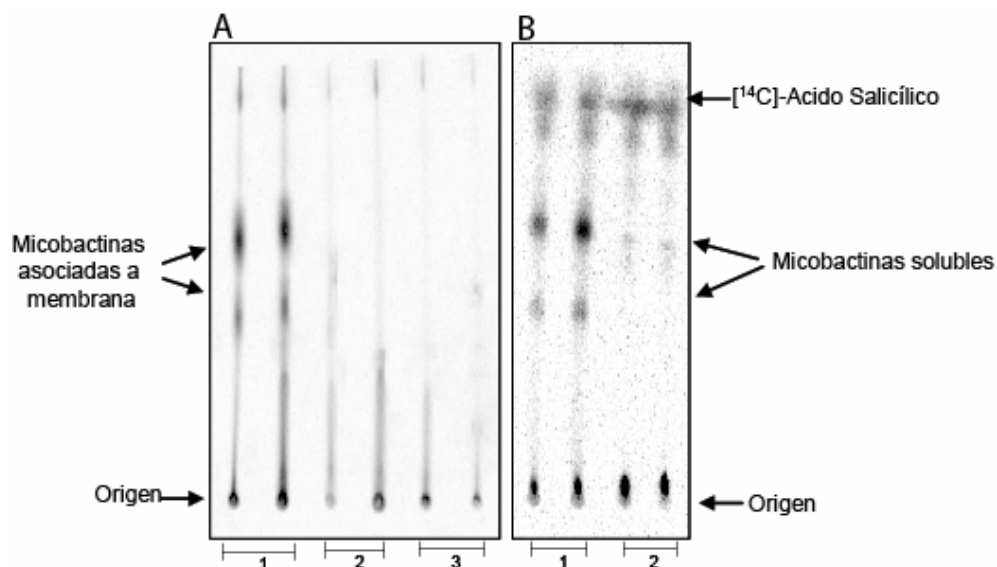


Figura 4.27: Inhibición de la síntesis de micobactinas. Radio-TLC de micobactinas asociadas a membrana (A) y micobactinas solubles (B). Carriles 1, 2 y 3 muestran micobactinas extraídas de cultivos tratados con DMSO, salicil-AMS y de la cepa deficiente en sideróforos *mbtF* respectivamente. Cada condición fue analizada por duplicado.

Por su parte *Y. pestis* se creció en medio PMH-D a saturación, después de lo cual se resuspendió en medio fresco a una densidad óptica de 0,1, para luego agregar el radioisótopo y, dependiendo del cultivo, DMSO o salicil-AMS. El cultivo fue incubado por otras 15 horas y luego de separar las células del medio de cultivo, yersiniabactina fue extraída de este último y analizada por radio-TLC. Para este experimento usamos la cepa KIM6 2082.1+ que solo produce yersiniabactina. Como control negativo usamos la cepa KIM6 2082.1, que es igual a la cepa anterior pero que además carece de la maquinaria para sintetizar yersiniabactina por delección del fragmento *p_{gm}*.

En los cultivos tratados, yersiniabactina mostró una reducción de al menos 5 veces cuando se los compara con los cultivos control tratados con DMSO (Figura 4.28 A y B). Como se esperaba, la cepa KIM6 2082.1 careció de la síntesis de este sideróforo. Como el sistema de solventes utilizado para desarrollar la radio-TLC no había sido descrito con anterioridad, la identidad de la señal en el radio-TLC (R_f : 0,39) se confirmó por espectrometría de masas usando ionización química por presión atmosférica, donde se obtuvo una máximo de intensidad m/z de 534,9 que es lo esperado para el complejo yersiniabactina-hierro ($C_{21}H_{24}N_3O_4S_3HFe^+ = m/z$: 535 (Perry, Balbo et al., 1999)) (Figura 4.28 C).

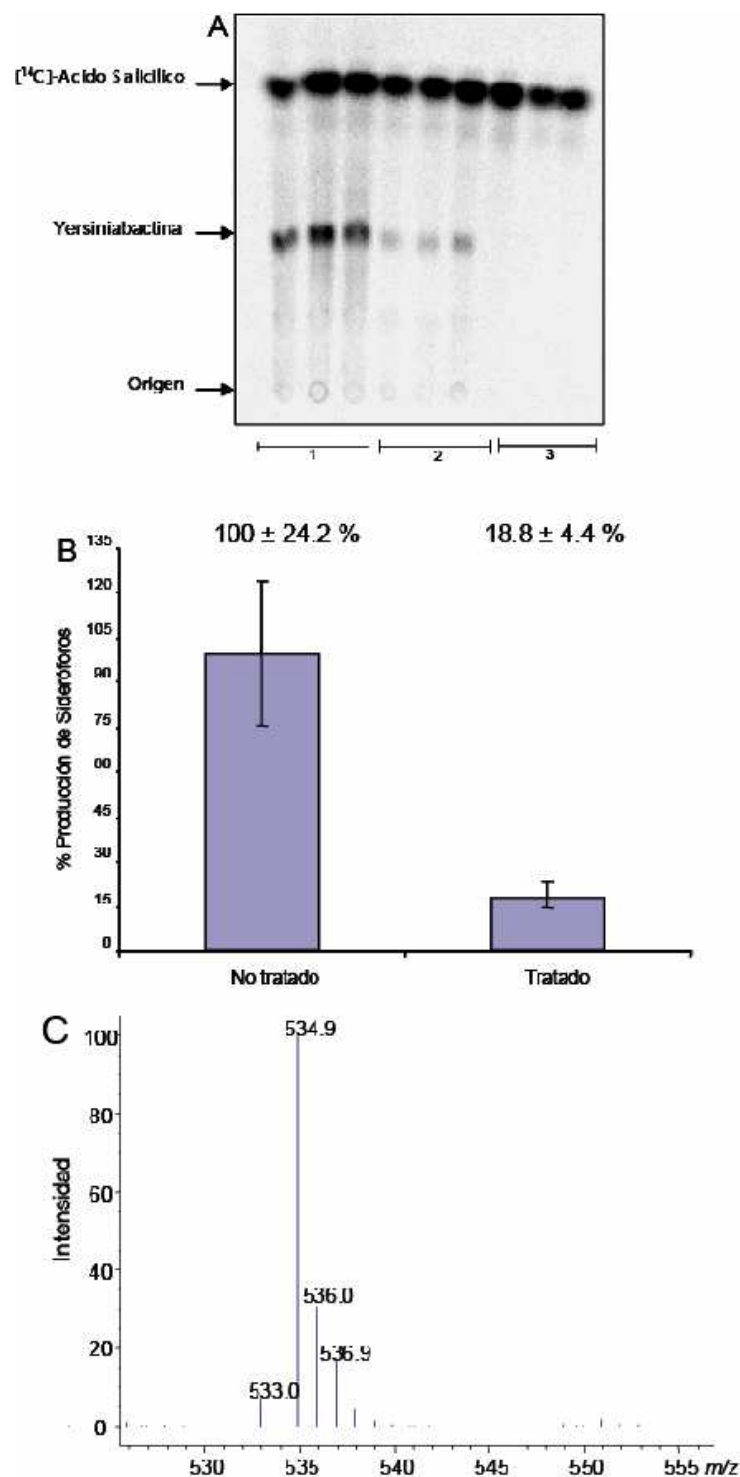


Figura 4.28: Inhibición de la síntesis de yersiniabactina. (A) Radio-TLC mostrando la síntesis de yersiniabactina en cultivos tratados con DMSO (carriles 1), tratados con salicil-AMS (carriles 2) y de la cepa deficiente en sideróforos KIM6 2082.1. Cada condición fue analizada por triplicado. (B) Cuantificación de la síntesis de sideróforos. El gráfico representa el promedio de la síntesis de yersiniabactina con el correspondiente desvío estándar. (C) Confirmación de la identidad de la señal en el radio-TLC (R_f : 0,39) por espectrometría de masas usando ionización química por presión atmosférica ($C_{21}H_{24}N_3O_4S_3HFe^+ = m/z$: 535).

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos con *P. aeruginosa* no se observó ningún cambio en la producción de pioquelina en cultivos tratados y no tratados. Como no había reportes previos de análisis de pioquelina por radio-TLC, primero evaluamos si éramos capaces de detectar la misma al marcarla con ácido salicílico radioactivo. Extractos de cultivos de *P. aeruginosa* crecidos con este isótopo durante dos horas en medio deficiente en hierro, mostraron señales a los R_f s previamente publicados para pioquelina (0,69 para pioquelina libre y 0,24 para el complejo pioquelina-hierro)(Cox and Graham, 1979) que estaban ausentes en los controles realizados tanto en cultivos suplementados con 100 μ M $FeCl_3$ donde la síntesis de pioquelina esta reprimida por la presencia de hierro, como en extractos realizados del medio de cultivo sin crecimiento bacteriano (Figura 4.29).

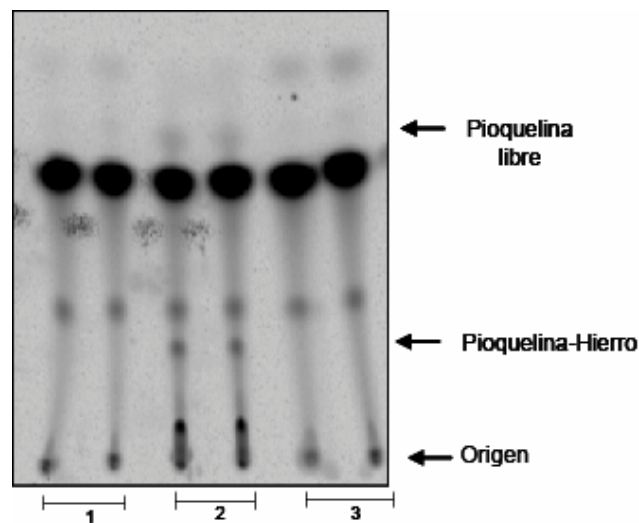


Figura 4.29: Radio-TLC mostrando la síntesis de pioquelina en cultivos de *P. aeruginosa*. (Carriles 1) Extracción de medio de cultivo DCAA sin crecimiento bacteriano. (Carriles 2) extracción de cultivos de *P. aeruginosa* en medio DCAA. (Carriles 3) extracción de cultivos de *P. aeruginosa* suplementados con 100 μ M $FeCl_3$. Cada condición fue analizada por duplicado. Las señales correspondientes a pioquelina libre y acomplejadas con hierro están indicadas con flechas (R_f s: 0,69 y 0,24 respectivamente), así como el origen de la TLC.

Para comprobar si salicil-AMS inhibía la síntesis de pioquelina, realizamos el mismo experimento pero agregando además salicil-AMS a 400 μ M, sin que se llegue a observar ningún cambio significativo en la síntesis de pioquelina en los cultivos que habían sido tratados con el inhibidor y que no habían sido suplementados con hierro

(Figura 4.30A). Al igual que lo obtenido anteriormente, la síntesis de pioquelina estuvo inhibida en los ensayos en lo que se agregó hierro.

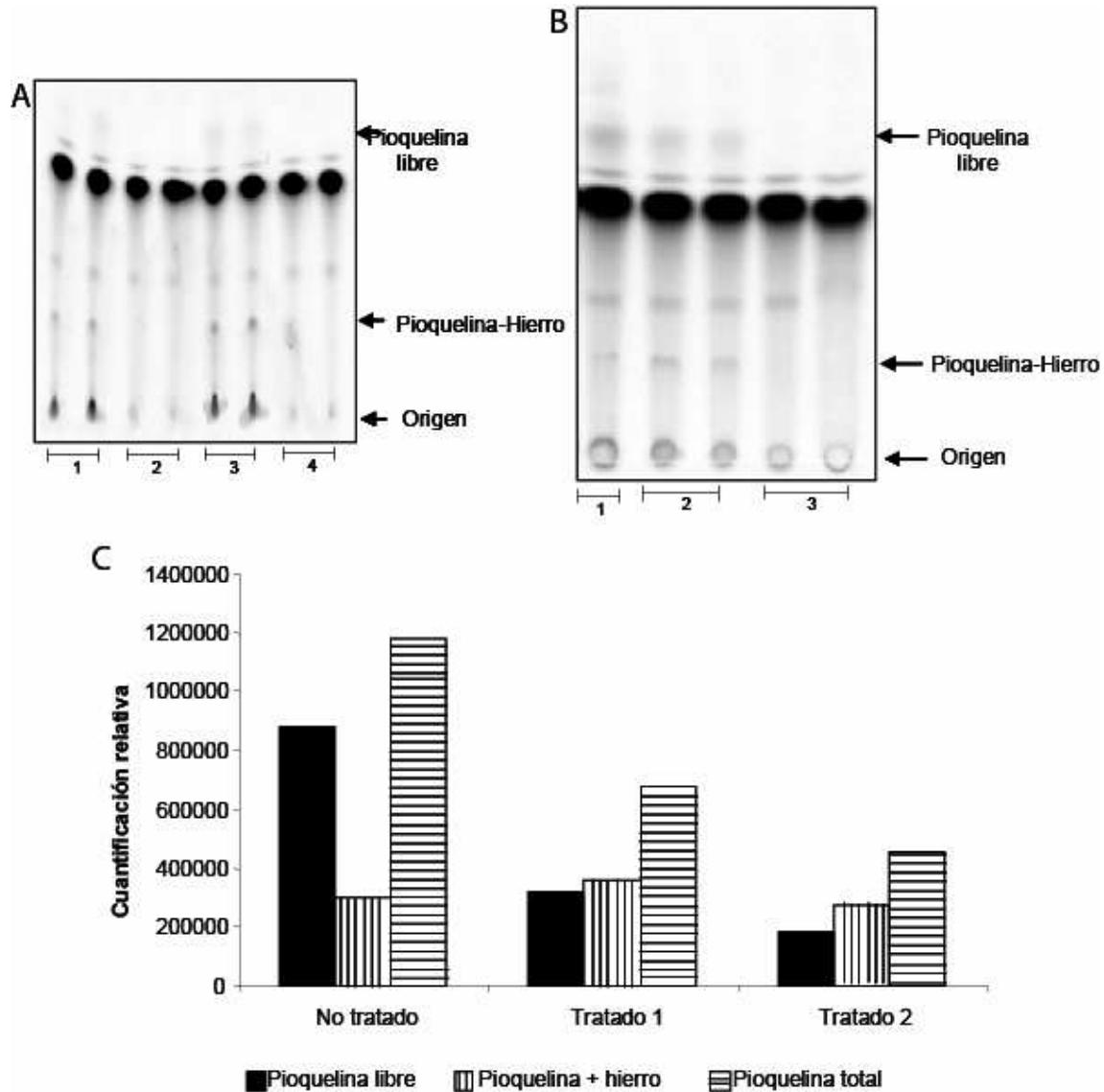


Figura 4.30: Ensayo de inhibición de pioquelina por salicil-AMS. **(A)** Radio-TLC mostrando la síntesis de pioquelina en cultivos de *P. aeruginosa* incubándolos con [14 C]-ácido salicílico y DMSO o salicil-AMS por dos horas (ver texto). Carriles 1 y 3 sin agregado de hierro. Carriles 2 y 4 suplementados con 100 μ M de FeCl_3 . Carriles 3 y 4 tratados con 400 μ M salicil-AMS. Carriles 1 y 2 con DMSO. **(B)** Radio-TLC mostrando la síntesis de pioquelina incubando el cultivo con [14 C]-ácido salicílico y DMSO o salicil-AMS por 30 minutos (ver texto). Carriles 1 y 2 sin agregado de hierro. Carriles 3 suplementados con 100 μ M de FeCl_3 . Carriles 2 tratados con 800 μ M salicil-AMS. Carriles 1 y 3 con DMSO. Cada condición fue analizada por duplicado excepto en B carril 1. Las señales correspondientes a pioquelina libre y acomplexadas con hierro están indicadas con flechas (R_f s: 0,69 y 0,24 respectivamente), así como el origen de la TLC. **(C)** Cuantificación relativa de pioquelina libre y unida a hierro en TLC B.

En el experimento anterior, tanto [^{14}C]-ácido salicílico como el inhibidor fueron agregados desde un comienzo, ya que como no contábamos con una cepa de *P. aeruginosa* deficiente en la producción de pioverdina, otro sideróforo, las bacterias contarían con la misma para poder crecer en caso de que pioquelina fuera inhibida.

La posibilidad de que la falta de inhibición de pioquelina se debiera a la presencia de bombas de eflujo que estuviesen eliminando el compuesto salicil-AMS o que este pudiese estar siendo degradado una vez que entraba a la célula, decidimos dar un pulso por un tiempo más breve durante el momento de síntesis activa del sideróforo. En este segundo intento, cultivos en medio deficiente en hierro se incubaron en presencia de [^{14}C]-ácido salicílico y el inhibidor a 800 μM durante 30 minutos, luego de haberlos crecido en el mismo medio por dos horas. Al igual que en el primer ensayo, no se observó ninguna diferencia en la cantidad de pioquelina-hierro pero se pudo observar una pequeña diferencia de 2,5-3 veces en pioquelina libre entre cultivos tratados y no tratados (Figura 4.30B-C).

4.5 Inhibición del crecimiento por salicil-AMS

Considerando que la síntesis de sideróforos es vital para el crecimiento de *Y. pestis* y *M. tuberculosis* en condiciones de baja concentración de hierro y que el compuesto salicil-AMS fue capaz de inhibir la síntesis de los mismos, decidimos analizar el efecto que este podría tener sobre el crecimiento cuando *Y. pestis* y *M. tuberculosis* son crecidas en condiciones tanto limitantes como de suficiencia de hierro.

En el caso de *Y. pestis*, al igual que en el ensayo donde observamos la inhibición de la síntesis de yersiniabactina, usamos la cepa de KIM6 2082.1+ que es capaz de sintetizar este sideróforo pero carece de los otros sistemas de adquisición de hierro. La presencia de estos últimos, eliminaría la posibilidad de usar la síntesis de yersiniabactina como blanco para la inhibición en los ensayos *in vitro*, ya que, aunque menos eficientes, permiten el crecimiento de *Y. pestis* en medios de cultivo con deficiencia de hierro.

Los ensayos de crecimiento se optimizaron para ser llevados a cabo en placas de 96 pocillos en los mismos medios de cultivos deficientes en hierro usados para la

detección de la síntesis de sideróforos a los cuales se les suplementó con FeCl_3 , para analizar el efecto del compuesto en condiciones de suficiencia de hierro.

Para comprobar que éramos capaces de detectar una inhibición del crecimiento en placas multipocillo por un bloqueo en la síntesis de sideróforo, realizamos ensayos preliminares donde comparamos el crecimiento de cepas que producen sideróforos, tanto de *Y. pestis* como de *M. tuberculosis* con cepas mutantes incapaces de sintetizarlos.

En los ensayos con *Y. pestis* comparamos el crecimiento de la cepa KIM6 2082.1+ (que produce solo yersiniabactina) con la cepa KIM6 2082.1 que, además de estar mutada en todos los sistemas de adquisición de hierro como la cepa anterior, es incapaz de producir yersiniabactina por una delección del locus *pgm*. En la figura 4.31, se observa que el crecimiento de la cepa KIM6 2082.1 es restringido cuando el medio de cultivo no es suplementado con hierro mientras que se recupera a medida que se incrementa la concentración de hierro en el mismo. Por otro lado, la cepa KIM6 2082.1+ no mostró diferencias significativas en ninguna de las condiciones de concentración de hierro evaluadas.

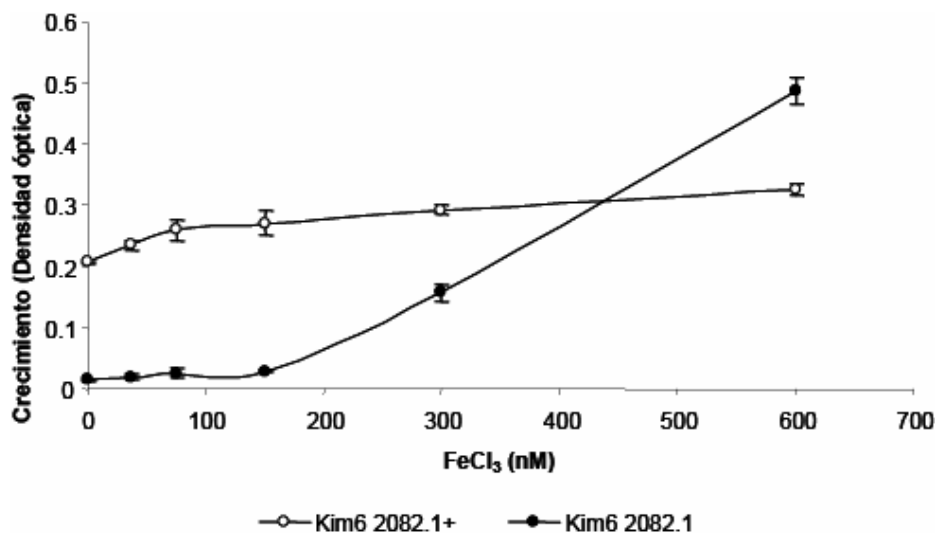


Figura 4.31: Crecimiento de *Y. pestis* en placas multipocillo en medio PMH-D. Tanto la cepa productora de yersiniabactina Kim6 2082.1+ como la mutante Kim6 2082.1 incapaz de sintetizarla fueron crecidas en concentraciones creciente de FeCl_3 durante 22 horas a 37°C . Cada punto fue realizado por triplicado y están graficados con el correspondiente desvío estándar.

En el caso de *M. tuberculosis* comparamos el crecimiento de la cepa H37rv con la

cepa mutante en el gen *mbtF* en medio deficiente y con suficiencia de hierro. En un ensayo durante 6 días, la cepa salvaje fue capaz de crecer en ambas condiciones, si bien en suficiencia de hierro mostró un mejor crecimiento. Por su parte, la cepa *mbtF* fue incapaz de crecer cuando el medio no fue suplementado con hierro, pero se recuperó después del cuarto día, en medio suplementado con 20 μM de FeCl_3 (Figura 4.32).

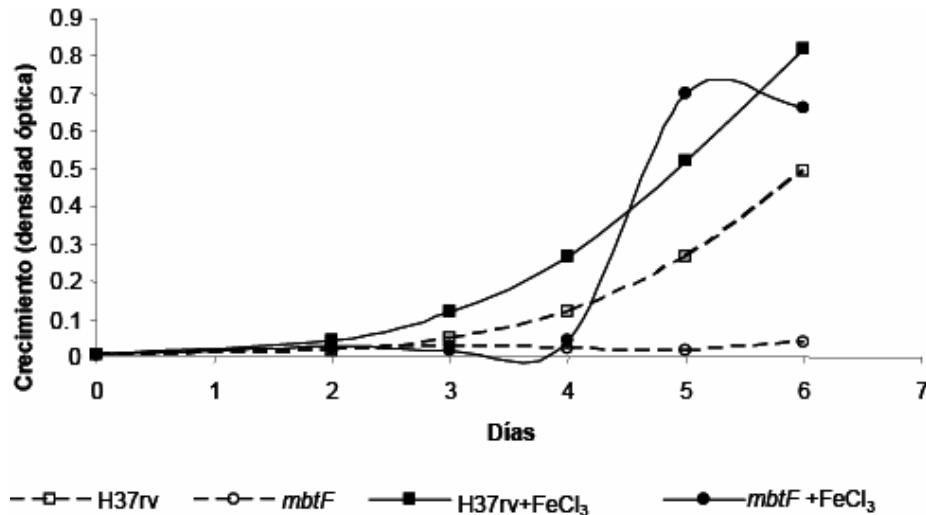


Figura 4.32: Crecimiento de *M. tuberculosis* en placas multipocillo en medio GAST-D. Tanto la cepa productora de micobactinas H37rv como la mutante *mbtF* incapaz de sintetizarla, fueron crecidas en condiciones de carencia y suficiencia de hierro durante 6 días a 37°C, controlando el crecimiento a tiempos regulares.

Cuando realizamos el experimento con el compuesto salicil-AMS, vimos que este efectivamente inhibió el crecimiento en forma diferencial según la disponibilidad de hierro presente en el medio tanto en *Y. pestis* como en *M. tuberculosis*.

En los ensayos con *M. tuberculosis*, salicil-AMS mostró una mayor potencia con respecto a lo obtenido en *Y. pestis*, con un IC_{50} de $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ en condiciones de insuficiencia de hierro, mientras que en condiciones de suficiencia, si bien inhibió el crecimiento, con un IC_{50} de $39,9 \pm 7,6 \mu\text{M}$, este es un valor 18 mayor que el obtenido anteriormente (Figura 4.33A).

En los ensayos con *Y. pestis* se obtuvo un IC_{50} de $51,2 \pm 4,7 \mu M$ en condiciones de limitación de hierro y no tuvo ningún efecto en condiciones de suficiencia del mismo, al menos hasta la más alta concentración analizada que fue de 8 veces el IC_{50} (Figura 4.33B).

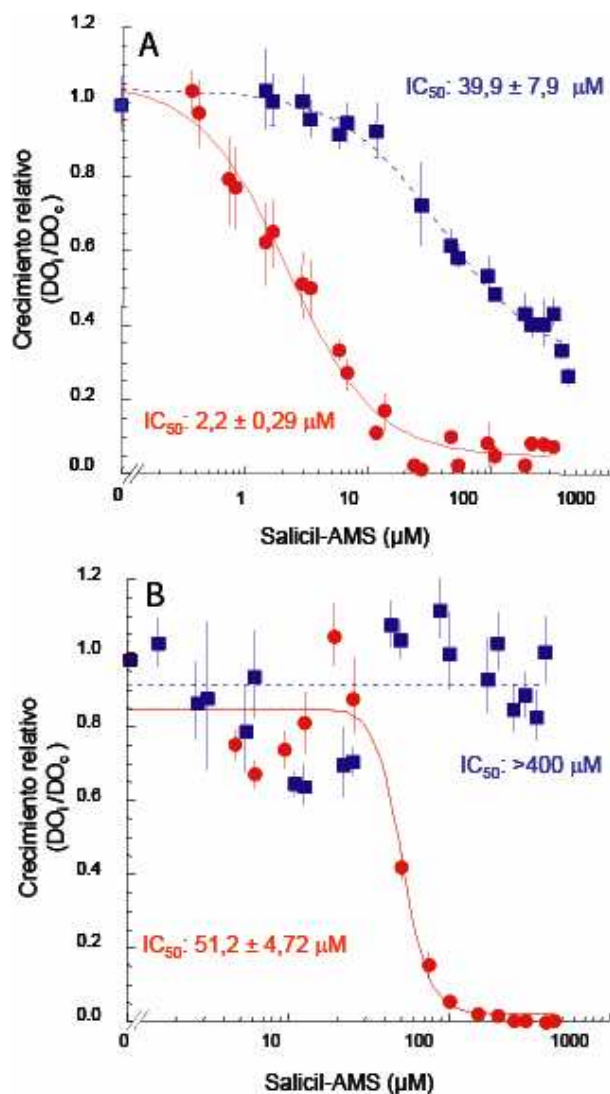


Figura 4.33: Inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* (A) y *Y. pestis* (B) en condiciones de deficiencia de hierro (círculos rojos) o de suficiencia de hierro (cuadrados azules), como función de la concentración de salicil-AMS. DO_i y DO_c , densidad óptica en presencia del inhibidor y en presencia de DMSO respectivamente. El gráfico muestra el promedio de triplicados con el correspondiente desvío estándar.

5. DISCUSIÓN

5 Discusión

5.1 Elección del blanco

Se ha demostrado que el hierro es esencial para el crecimiento de muchas bacterias y que juega un rol importante en el establecimiento y la progresión de las infecciones producidas por varios microorganismos, entre ellos *M. tuberculosis* y *Y. pestis*. En el hospedador, el hierro se encuentra mayormente unido a proteínas que hace imposible su uso directo por parte de las bacterias. Esto ha obligado a los microorganismos a desarrollar mecanismos específicos para adquirirlo. Algunos de ellos involucran la síntesis de moléculas denominadas sideróforos, que por su alta afinidad por el ion férrico, son capaces de “robar” el hierro de las proteínas a las cuales se encuentra unido y mediar su incorporación a la célula donde, por un mecanismo todavía no aclarado, queda disponible para su uso.

Los mecanismos bacterianos de adquisición de hierro ofrecen un sinnúmero de posibilidades para interferir en su proceso o hacer uso del mismo para el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Entre estas posibilidades se encuentran, el uso de agentes quelantes para disminuir la concentración de hierro, el uso de sideróforos para transportar drogas que se encuentran acomplexadas a los mismos, o la inhibición directa de la síntesis de sideróforos.

La primera estrategia tiene especial relevancia en ciertas regiones de África donde existe una alta incidencia de sobrecarga de hierro debido principalmente a la dieta. Además de provocar varios problemas en la salud, este exceso de hierro favorece la replicación del VIH y de *M. tuberculosis*. Debido a esto último, junto al hecho de que independientemente de la disponibilidad de hierro, la replicación del VIH y la progresión del sida se ven incrementadas si el paciente además desarrolla tuberculosis y que esta última a su vez se ve favorecida por el débil sistema inmune producto de la infección por VIH, no es de extrañar que la mayoría de los casos de doble infección VIH/tuberculosis se den en esta región. En estas circunstancias, el uso de agentes quelantes por lo tanto tiene un gran aplicabilidad en este contexto, donde no solo ayuda a controlar las infecciones, sino que disminuye los demás efectos que el exceso de hierro genera en la salud. Pero como el hierro esta involucrado en muchas funciones importantes para el

hospedador y la regulación de sus niveles es compleja, una terapia a base de agentes quelantes para tratar tuberculosis, probablemente no sea siempre posible (Meyer, 2006).

Otra de las estrategias posibles y que se han empleado se basa en el transporte activo de sideróforos, donde complejos sideróforo-antimicrobiano son incorporados a la célula a través de los mecanismos de asimilación de hierro. De esta manera, drogas cuya penetración a la célula estaba restringida por una baja permeabilidad de las envolturas celulares, pueden introducirse con el transporte de un nutriente esencial, en este caso, hierro. Como generalmente cada especie reconoce sus propios sideróforos, una molécula diseñada de esta manera puede mostrar elevada especificidad. En estas moléculas el sideróforo debe estar cargado con hierro para poder ser transportado y el antimicrobiano debe estar unido al sideróforo de manera de no interferir ni en el reconocimiento ni en la internalización a la celular. Esta unión entre el sideróforo y la droga esta dada por un espaciador que eventualmente podría ser digerido en forma enzimática una vez dentro de la célula (Dolence, Minnick et al., 1991; Ghosh and Miller, 1995; Roosenberg, Lin et al., 2000). Si bien esta estrategia tiene la ventaja de poder ser específica para la especie que reconoce al sideróforo utilizado y de permitir introducir drogas a través de envolturas celulares que de otra manera serian impermeables, podría verse limitada por la producción por parte del hospedador, de proteínas con capacidad de unión a los sideróforos, como siderocalina, como parte de la respuesta inmune de dificultar el acceso al hierro por parte de la bacteria que produce la infección (Holmes, Paulsene et al., 2005).

Por último, el desarrollo de inhibidores de la síntesis de sideróforos ofrece un gran potencial si consideramos las numerosas proteínas involucradas en los mismos, pero este desarrollo se ha visto limitado en gran medida por el poco conocimiento que se tenían de los mecanismos biosintéticos de los mismos. Los avances que se produjeron en los últimos años en esta área, junto con la resolución de estructuras cristalinas de algunas de las enzimas, nos ha permitido el desarrollo del primer inhibidor diseñado para inhibir la síntesis de sideróforos en *M. tuberculosis* y *Y. pestis*.

Los sideróforos micobactina y yersiniabactina, producidos por *M. tuberculosis* y *Y. pestis* respectivamente, son sintetizados por un complejo enzimático que involucra NRPSs y PKSs. El primer paso de síntesis de ambos sideróforos involucra la activación y

el cargado del ácido salicílico en el correspondiente ArCP y es realizado por proteínas que comparten el mismo mecanismo enzimático (MbtA en *M. tuberculosis* y YbtE en *Y. pestis*), generando un intermediario, salicil-AMP, con una alta afinidad por la enzima. Esta característica abre la posibilidad de diseñar un análogo del intermediario, salicil-AMS, en el que se pierde la capacidad de transferir el salicilato al dominio ArCP correspondiente, manteniendo de esta manera la enzima bloqueada en ese paso. Como tanto MbtA y YbtE generan el mismo intermediario a través del mismo mecanismo, este análogo debería inhibir a ambas. Además, aunque este trabajo no estaba enfocado primariamente a la inhibición de la síntesis de sideróforos en *P. aeruginosa*, el hecho de que esta última sintetice el sideróforo pioquelina, cuyo primer paso de síntesis comprende la adenilación del ácido salicílico por un mecanismo idéntico al mostrado por MbtA y YbtE, postulamos que la enzima PchD, responsable de este paso en *P. aeruginosa*, debería también ser inhibida por este compuesto.

En *M. tuberculosis*, la inhibición de MbtA significará la pérdida tanto de micobactinas asociadas a membrana como solubles, ya que su estructura común es sintetizada a partir de las mismas enzimas y como estos dos sideróforos son los únicos que la bacteria produce, la inhibición de los mismos evitará el crecimiento de la bacteria en condiciones de insuficiencia de hierro.

Por su parte *Y. pestis* posee otros sistemas de adquisición de hierro además de la síntesis del sideróforo yersiniabactina, como son los sistemas de adquisición de hierro orgánico Hmu y los hemóforos HasA, o los sistemas de adquisición de hierro inorgánico Yfe y Yfu. Estos sistemas poseen una menor afinidad por el hierro pero pueden ser utilizados en caso de que yersiniabactina sea inhibida en un cultivo con limitación de hierro, permitiendo que la bacteria crezca. En cambio, *in vivo* la multiplicación y virulencia de *Y. pestis* se vería afectada, ya que se ha comprobado que yersiniabactina es importante en infecciones a través de rutas periféricas (Lillard, Bearden et al., 1999), que es la forma en que una persona puede infectarse por la picadura de una pulga infectada. En nuestro estudio, para poder analizar el efecto del compuesto salicil-AMS sobre la producción de yersiniabactina y a su vez el efecto que la posible inhibición del sideróforo podría tener sobre el crecimiento de la bacteria, usamos la cepa KIM6 20821.1+ (Gong, Bearden et al., 2001) que por mutaciones en los otros sistemas, solo puede adquirir hierro

a través del sideróforo yersiniabactina.

P. aeruginosa, por su parte, produce el sideróforo pioverdina además de pioquelina, por lo que la inhibición de este último por salicil-AMS, no afectaría el crecimiento en medios de cultivo bajo en hierro, ya que la bacteria podría usar pioverdina. Al no contar con una cepa mutante que solo produzca pioquelina, no pudimos analizar si el crecimiento de la bacteria era inhibido en presencia de salicil-AMS, ya que su probable inhibición era compensada por la adquisición de hierro a través de pioverdina.

5.2 Diseño del inhibidor

Cuando las enzimas MbtA, YbtE y PchD activan el ácido salicílico, forman el intermediario salicil-AMP que es luego hidrolizado cuando estas enzimas lo transfieren al correspondiente holo-ArCP. Por la tanto, esta unión fosfato entre el salicilato y el AMP es la que debía ser reemplazada por una unión estable que no sea hidrolizable.

Nucleocidin es un nucleósido de adenosina con grupos 4'fluor 5'sulfamoil (Morton, Lancaster et al., 1969) producido por *Streptomyces calvus* (Backus, Tresner et al., 1957) que, aunque sea tóxico para mamíferos, es activo contra bacterias gram negativas, gram positivas y tripanosomas (Peterson, Brownell et al., 1992), siendo la síntesis proteica su blanco de acción (Florini, Bird et al., 1966). Desde su descubrimiento, varios análogos defluorinados se han sintetizados y han mostrados por tener un amplio rango de actividad que van desde actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana (Peterson, Brownell et al., 1992). Esto nos impulsó a diseñar el compuesto salicil-AMS, donde agregamos una molécula de salicilato al grupo sulfamoil de una molécula similar a nucleocidin pero sin el grupo 4' fluor (5'-O-sulfamoiladenosina). El reemplazo del grupo fosfato en la molécula salicil-AMP por un grupo sulfato se vio además apoyado por el análisis de la unión del intermediario 2,3-dihidroxibenzoil-AMP al sitio activo de la enzima DhbE, donde la unión del grupo fosfato parece involucrar primariamente interacciones por uniones de hidrógeno más que interacciones electroestáticas, por lo que el grupo sulfamato sin carga en el compuesto salicil-AMS, parece reemplazar perfectamente al grupo fosfato de salicil-AMP.

El uso de un grupo sulfamato por un grupo fosfato ya ha sido utilizado para la síntesis de inhibidores de enzimas que adenilan aminoácidos ya sea por sintetisas de ARN de transferencia (Hurdle, O'Neill et al., 2005) o por enzimas que forman parte de NRPSs (Finking, Neumuller et al., 2003). Estos compuestos, si bien han mostrado ser potentes inhibidores de las enzimas correspondientes, presentan el inconveniente que inhiben tanto a enzimas de adenilación de aminoácidos de bacterias como sus contrapartes eucariotas. Esto convierte al compuesto salicil-AMS en un excelente candidato, ya que en mamíferos no se encuentra ninguna enzima homóloga a las enzimas de adenilación de ácido salicílico conocida.

5.3 Caracterización del inhibidor en ensayos *in vitro*

El diseño del inhibidor se basa en la síntesis de un compuesto que mimetiza el intermediario formado por las enzimas de adenilación pero que, por una modificación en su estructura (el reemplazo del grupo fosfato por un grupo sulfamato), estas son incapaces de hidrolizarlo para continuar con la síntesis. Además, como generalmente este intermediario posee una muy baja constante de disociación, el compuesto que lo mimetiza bloquearía la enzima casi en forma permanente ya que, al no poder llevarse a cabo el siguiente paso de síntesis, este compuesto permanecería unido a la enzima que quedaría así incapacitada para un nuevo ciclo de formación del intermediario. Esto haría que este inhibidor, si bien no formaría uniones covalentes con la enzima, se comportara como un inhibidor irreversible.

Esto nos condujo a pensar que posiblemente el compuesto salicil-AMS se comportaría como un inhibidor de unión fuerte. Estos inhibidores, debido a la muy alta afinidad que poseen por la enzima, se caracterizan por valores de K_i^{ap} muy bajos cercanos a la concentración de enzima usada en el ensayo. A diferencia de los demás inhibidores reversibles donde los valores de K_i son mucho mayores que la concentración de enzima utilizada (más de 1000 veces), la formación del complejo enzima-inhibidor afecta a la concentración efectiva del inhibidor libre en la reacción en el rango de concentraciones donde el compuesto es efectivo. Esto hace que la metodología de estudio de los inhibidores reversibles ya no sea válida para los inhibidores de unión fuerte. Así

por ejemplo, el IC_{50} de un inhibidor de unión fuerte además de depender del K_i del compuesto y poder depender de la concentración de sustrato y del K_m del mismo como es en el caso de los inhibidores comunes reversibles, depende de la concentración de enzima presente en la reacción.

La primera comprobación de que salicil-AMS podía ser un inhibidor de unión fuerte fue a través de ensayos de intercambio [32 P]PPi/ATP con las enzimas MbtA, YbtE y PchD, donde obtuvimos valores de IC_{50} que correspondían aproximadamente a la mitad de la concentración de la enzima utilizada en la reacción (figura 4.7). Esto se corresponde con una relación estequiométrica 1:1 entre el inhibidor y la enzima, lo que indica que posiblemente cada molécula de inhibidor presente en la reacción está bloqueando en forma permanente, o al menos mientras dura la reacción, a una molécula de enzima. Como no se forman uniones covalentes, esto solo se lograría con una muy baja constante de disociación entre el compuesto y la enzima.

Debido a que el mecanismo de acción de las tres enzimas es similar, involucrando un sitio de unión al sustrato semejante, decidimos continuar con la caracterización del inhibidor utilizando solamente una enzima, eligiendo YbtE para ello.

Debido a esta relación estequiométrica entre inhibidor y enzima, es de esperar que un aumento en esta última provoque un aumento de la cantidad de inhibidor necesario para inhibirla, aumentando de esta manera el IC_{50} . Un análisis de la variación del IC_{50} a diferentes concentraciones de enzima (figura 4.8) mostró que este varía en forma lineal con una pendiente cercana a 0,5 lo que es diagnóstico de un inhibidor de unión fuerte. Cuando analizamos la pendiente graficando los valores de IC_{50} sobre la concentración de enzima nominal, es decir sobre la concentración de enzima calculada a través del método colorimétrico (ver Materiales y Métodos, sección 3.4), la pendiente fue de 0,42, mientras que cuando lo hicimos basado en la concentración calculada a través de la ecuación 1 (Materiales y Métodos, sección 3.9) usada para ajustar la curva de concentración-respuesta, la pendiente es de 0,52. Esta diferencia puede deberse por un lado a pequeños errores en el cálculo de concentración de la enzima por el método colorimétrico o diferencias en la proporción de moléculas de enzima activas o inactivas. Por el contrario,

la concentración de enzima calculada a partir de la ecuación 1 refleja la concentración de enzima activa, sin importar aquellas moléculas presentes sin actividad u otras proteínas contaminantes que pudiesen estar presentes en la reacción. De esta manera, tal cual observamos en nuestros experimentos, es de esperar que la pendiente calculada a partir de la ecuación 1 se acerque más a 0,5 que aquella calculada a partir de métodos colorimétricos.

En los inhibidores de unión fuerte el K_i^{ap} de la ecuación 1 usada para ajustar las curvas de concentración respuesta varía de acuerdo a si el inhibidor es competitivo o no competitivo con respecto al sustrato. En el primer caso, el K_i^{ap} varía con la concentración de sustrato analizado mientras que en el segundo este es independiente, siendo igual el K_i^{ap} y el K_i . En nuestros estudios, salicil-AMS mostró ser competitivo con respecto al ATP y no competitivo para el ácido salicílico (Figuras 4.9 y 4.10). El K_i calculado a partir de los K_i^{ap} obtenidos fue similar en ambas serie de experimentos, siendo de $0,25 \pm 0,27$ nM cuando se hizo a partir de los valores de K_i^{ap} obtenidos en los experimentos donde variamos la concentración de ATP, y de $1,08 \pm 0,98$ nM cuando el K_i se calculó a partir del K_i^{ap} obtenidos en los experimentos donde variamos la concentración de ácido salicílico.

Estos valores de K_i están de acuerdo con otros valores de K_i obtenidos para otros acil-AMS utilizados para inhibir enzimas de adenilación y muestran que salicil-AMS es un potente inhibidor de YbtE que se comporta como un inhibidor de unión fuerte.

Además nuestros datos se ven apoyados por una publicación que apareció en 2006 (Miethke, Bissler et al., 2006) luego de que nuestro trabajo fuese publicado, que describe la síntesis y la caracterización del inhibidor salicil-AMS, fuese publicado en 2005 (Ferrerías, Ryu et al., 2005). En este trabajo, Miethke y colaboradores, mostraron la inhibición de YbtE y DhbE por salicil-AMS y otras moléculas relacionadas, reportando un K_i de 29 nM, que si bien es unas 30 veces mayor a lo que nosotros obtuvimos, está por debajo de la concentración de enzima utilizada en ese estudio (300 nM), indicando un tipo de inhibidor de unión fuerte. La diferencia en los valores de K_i entre este trabajo y el

nuestro bien puede deberse a diferencias experimentales o a que ellos usaron gráficos de Dixon para la determinación del K_i que se usan comúnmente para determinar modalidad de inhibición en inhibidores reversibles. En este tipo de gráficos, el recíproco de la velocidad se grafica en contra de la concentración de inhibidor y el K_i se obtiene de la intersección de las regresiones lineales de ensayos de concentración-respuesta a dos o tres concentraciones de sustratos. Esto, sumado a la alta concentración de enzima utilizada, y considerando la dependencia del K_i^{ap} de la concentración de enzima pueden explicar el valor más alto que ellos obtuvieron. Se ha demostrado además, que cuando los datos se transforman para obtener regresiones lineales se agrega un error que se evita ajustando los datos directamente.

A diferencia de nuestro trabajo donde observamos que el compuesto salicil-AMS mostraba un comportamiento no competitivo con respecto al ácido salicílico, en Miethke y colaboradores observan que la capacidad de inhibición fue inversamente proporcional a la concentración de ácido salicílico (no fue analizado con respecto al ATP), indicando un posible modo de inhibición dependiente de este sustrato. Esta discrepancia puede deberse a que nosotros determinamos la modalidad de inhibición a través del análisis del comportamiento del K_i^{ap} calculado a partir del ajuste directo de los datos obtenidos, sin transformarlos a un gráfico lineal. En cambio, ellos determinaron la modalidad de inhibición a través de una gráfica lineal (gráfico de Dixon). Se ha visto que el uso de regresiones lineales para determinar modalidad de inhibición, como el uso de gráficos doble recíproco, ha causado errores en la interpretación de la modalidad de inhibición en inhibidores de unión fuerte (Copeland, 2000) donde, independientemente de la modalidad de inhibición, nunca muestran un comportamiento lineal, pero que solo es evidente a altas concentraciones de sustrato. En este trabajo, ellos usaron un rango de concentraciones de ácido salicílico de 0,64 a 2,6 veces el K_m (3,5 μ M calculado por ellos, 4,6 μ M calculado por nosotros). Por lo tanto, el uso de gráficos de Dixon para graficar los resultados obtenidos en este trabajo, bien podrían explicar estas diferencias con nuestros resultados.

Como el compuesto salicil-AMS inhibe la formación del intermediario salicil-AMP, el siguiente paso, la formación del intermediario salicil-ArCP también debe estar

inhibida. Para probar este concepto, desarrollamos un ensayo de adenilación *in vitro* en placas de 96 pocillos (FlashPlate), usando la enzima YbtE y el dominio holo-ArCP de la enzima multidominio HMWP2 con una cola de histidinas. En este ensayo, la cubierta esescentilante presente en las paredes de los pocillos, detecta por un efecto de proximidad, el ácido salicílico tritiado incorporado por la enzima YbtE al dominio holo-ArCP-H6 previamente unido a la cubierta de Ni^{2+} también presente en los pocillos.

Este ensayo se basa en la distancia limitada que las partículas subatómicas liberadas por átomos radioactivos pueden viajar a través del agua. De esta manera, si el átomo emisor está a una distancia mayor del compuesto escintilante que la distancia que la partícula liberada recorre, este no será excitado y por lo tanto no emitirá ninguna señal. El uso de ácido salicílico tritiado en nuestro estudio presenta la ventaja que como el tritio posee una distancia de recorrido muy corta (1,5 μm), disminuye la posibilidad de ruido inespecífico en la señal por moléculas no incorporadas al holo-ArCP.

Aunque la salicilación del dominio ArCP se puede medir por otros medios ya usados anteriormente, como son la precipitación del dominio modificado usando ácido tricloroacético y luego midiendo la incorporación del ácido salicílico radioactivo en un contador de centelleo (Gehring, Mori et al., 1998), la optimización de la reacción en placas multipocillo nos permitió desarrollar un formato de ensayo para ser usado en el futuro en la búsqueda de inhibidores de la reacción a gran escala.

Como esperábamos, salicil-AMS fue un potente inhibidor de la reacción de salicilación, con valores de IC_{50} por debajo de la concentración de enzima calculada a partir del ajuste de las curvas de concentración-respuesta. Al igual que en los ensayos de inhibición de adenilación, el IC_{50} fue mayor cuando mayor concentración de enzima fue usado. En estos ensayos vimos además una diferencia importante entre la concentración de enzima nominal usada en el experimento y la concentración de enzima calculada a partir del ajuste de las curvas. Aquí se debe tener en cuenta por un lado que la concentración nominal de enzima fue estimada a partir de un método colorimétrico que no distingue entre moléculas de enzima activa o moléculas desnaturalizadas y que por otro lado, el ensayo no está optimizado para el cálculo de cinéticas enzimáticas, ya que los sustratos son usados muy por debajo de los respectivos K_m y uno de los componentes

(el dominio holo-ArCP) no puede difundir libremente al estar inmovilizado a las paredes del pocillo.

5.4 Inhibición de la síntesis de sideróforos

Como salicil-AMS inhibió la actividad de las enzimas MbtA, YbtE y PchD, evaluamos a continuación la capacidad de este compuesto de inhibir la síntesis de sideróforos tanto en *M. tuberculosis*, *Y. pestis* y *P. aeruginosa* cuando estas se crecieron en medios de cultivo que inducían la producción de los mismos. Para ello, basados en trabajos previos (De Voss, Rutter et al., 2000), desarrollamos un método de detección de sideróforos por radio-TLC, donde al cultivo se le daba un pulso con [³H]-ácido salicílico para poder marcarlos.

Como los sideróforos son esenciales para el crecimiento en condiciones de restricción de hierro, especulamos que estas bacterias no crecerían en presencia de salicil-AMS y por lo tanto debíamos agregar el compuesto una vez que el cultivo hubiera alcanzado un crecimiento suficiente como para no ser inhibido por el mismo y permitir que solamente se marcaran con [³H]-ácido salicílico los sideróforos sintetizados a partir solamente del comienzo del tratamiento.

Como esperábamos, los resultados obtenidos nos permitieron comprobar que efectivamente salicil-AMS inhibió la producción de micobactinas y yersiniabactina, a niveles prácticamente indetectables en las primeras y de unas 5 veces en la segunda. En cambio pioquelina solo fue inhibida moderadamente bajo ciertas condiciones. Cuando el tratamiento fue durante dos horas, esta inhibición no fue apreciable pero cuando este se hizo durante media hora obtuvimos una inhibición de entre 1,7 y 2,5 veces.

Los datos obtenidos en este trabajo y que fueron publicados en 2005 (Ferrerias, Ryu et al., 2005) fueron confirmados por otra publicación aparecida con posterioridad (Somu, Boshoff et al., 2006), donde muestran al igual que nosotros, inhibición de la síntesis de sideróforos en *M. tuberculosis* por salicil-AMS y otras moléculas relacionadas.

La falta de inhibición de la síntesis de pioquelina cuando el cultivo de *P.*

aeruginosa se trató con salicil-AMS durante dos horas, abría la posibilidad de que esto se debiera a una falta de penetración del compuesto, a la presencia de bombas de eflujo que estuvieran eliminando el compuesto, o que sea degradado una vez dentro de la célula. Para contrarrestar estos problemas decidimos aumentar al doble la concentración de compuesto (de 400 μM a 800 μM) y tratar el cultivo por un período más breve de tiempo (solo 30 minutos), donde efectivamente disminuyó la capacidad para la síntesis de pioquelina. Si bien este experimento no resuelve el problema de por qué no observamos inhibición en el primer experimento, ya que al aumentar la concentración de compuesto, afectamos tanto la penetración del mismo, la capacidad de las bombas para expulsarlo o la capacidad de un posible mecanismo de degradación, probamos el concepto de que la inhibición de PchD, debería afectar la síntesis de pioquelina por parte de la bacteria.

5.5 Inhibición del crecimiento

En este trabajo, además de haber probado en forma bioquímica que las enzimas involucradas en la incorporación del ácido salicílico a la ruta biosintéticas de los sideróforos de *M. tuberculosis*, *Y. pestis* y *P. aeruginosa*, son inhibidas por salicil-AMS y que esto efectivamente afecta la síntesis de los mismos, probamos que cultivos de *M. tuberculosis* y *Y. pestis* son afectados en su crecimiento cuando son tratados con este compuesto en condiciones de insuficiencia de hierro.

Los IC_{50} obtenidos (*M. tuberculosis*: $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$; *Y. pestis*: $51,2 \pm 4,7 \mu\text{M}$) son relativamente altos comparados con la capacidad de inhibición del compuesto salicil-AMS en los ensayos bioquímicos (en el rango de concentración nM), indicando posiblemente un problema de penetración o de algún mecanismo de las bacterias para expulsarlo una vez que este entra. Diferencias entre *M. tuberculosis* y *Y. pestis* en este sentido podrían explicar además las diferencias en la susceptibilidad que presentan al compuesto. Por otro lado, si bien la cepa de *Y. pestis* utilizada en estos ensayos solo puede adquirir hierro a través de la síntesis de yersiniabactina, se ha llegado a sugerir que *Y. pestis* podría contar con otro sistema de adquisición de hierro de baja eficiencia no identificado aún y que podría estar de alguna manera contrarrestando el efecto de la inhibición de yersiniabactina.

En un trabajo reciente, Somu y colaboradores (Somu, Boshoff et al., 2006) mostraron valores de MIC_{99} para el salicil-AMS en cultivos de *M. tuberculosis* de 0,29 μ M, comparables en sus experimentos con los obtenidos con la droga isoniazida que se usa en la primera línea de tratamiento contra la tuberculosis. Esta diferencia en los valores entre uno y otro experimento puede ser explicada en la mucho menor densidad óptica con la que Somu y colaboradores comenzaron sus experimentos (entre 2 y 3 órdenes de magnitud por debajo que nuestros experimentos), mostrando a su vez, la influencia que el tamaño de inóculo puede tener en la capacidad de inhibición.

Para demostrar que esta inhibición era debido a la carencia de sideróforos, el mismo experimento de inhibición se realizó en cultivos suplementados con hierro, donde la síntesis de lo mismos no es requerida. En el rango de concentraciones analizado en *Y. pestis* el crecimiento no fue afectado, mientras que en *M. tuberculosis*, si bien mostró capacidad de inhibición, el IC_{50} aumentó unas 18 veces. Esto indica que efectivamente salicil-AMS afecta el crecimiento de estas bacterias en condiciones de limitación de hierro al afectar los mecanismos de adquisición del mismo, pero además, el hecho de que también veamos una cierta inhibición en el crecimiento de *M. tuberculosis* en condiciones de suficiencia de hierro, indica posiblemente o que todavía necesite un cierto nivel de síntesis de micobactinas, o que este afectando a algún otro mecanismo esencial a la bacteria pero no relacionado a la síntesis de sideróforos. No podemos descartar que esta inhibición también se produzca en *Y. pestis*. La concentración más alta de salicil-AMS probada en esta cepa fue unas 8 veces mayor el valor de IC_{50} obtenido en ausencia de hierro, mientras que para *M. tuberculosis* la concentración más alta probada fue unas 180 veces mayor al IC_{50} . A concentraciones de salicil-AMS de 8 veces el valor de IC_{50} , el crecimiento de *M. tuberculosis* tampoco se ve afectado cuando el cultivo es suplementado con hierro.

6. CONCLUSIONES

6 Conclusiones

1.- El conocimiento de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los sideróforos en *M. tuberculosis*, *Y. pestis* y *P. aeruginosa* nos permitió desarrollar en forma racional un inhibidor, salicil-AMS, que mimetiza el intermediario formado en el primer paso de síntesis.

2.- Tal como esperábamos, este compuesto mostró ser un potente inhibidor de la actividad de las enzimas MbtA, YbtE y PchD cuando ésta fue analizada *in vitro*, comportándose como un inhibidor de unión fuerte. Consecuentemente con la inhibición de la actividad enzimática, salicil-AMS fue capaz de inhibir la síntesis de sideróforos cuando estas bacterias fueron crecidas en medios de cultivo deficientes en hierro. También mostramos que la inhibición de la síntesis de sideróforos por salicil-AMS, inhibió en última instancia, el crecimiento bacteriano de *M. tuberculosis* y *Y. pestis*.

3.- Si bien el IC_{50} mostrado por salicil-AMS en cultivo es relativamente alto comparado con la capacidad de inhibición *in vitro*, trabajos posteriores a este (Miethke, Bissler et al., 2006; Somu, Boshoff et al., 2006) mostraron que moléculas con pequeñas variaciones salicil-AMS, pueden inhibir igualmente estas enzimas o que se puede mejorar su actividad en cultivos celulares, abriendo la posibilidad para la búsqueda de moléculas relacionadas que mejoren la actividad *in vivo*, por lo que actualmente nos encontramos avocados al desarrollo y análisis de nuevos análogos de salicil-AMS.

4.- Este trabajo también permitió desarrollar dos formatos de ensayos que pueden ser automatizados para la búsqueda de inhibidores a gran escala en librerías de compuestos al azar. Por un lado, el ensayo enzimático desarrollado en placas multipocillos FlashPlate para detectar la salicilación del dominio ArCP puede ser usado para la detección de moléculas que inhiban específicamente esta actividad, mientras que la optimización de crecimiento de estas bacterias en placas multipocillos en condiciones de baja concentración de hierro, permite la búsqueda de compuestos que puedan inhibir el crecimiento al bloquear cualquier enzima involucrada en la adquisición de hierro. Actualmente, experimentos tendientes a optimizar estos ensayos para ser usados en la búsqueda a gran escala de inhibidores, están siendo llevados a cabo en el laboratorio.

5.- Por último, según nuestro conocimiento, el compuesto salicil-AMS descrito en este trabajo, es el primer inhibidor confirmado bioquímicamente que inhibe la síntesis de sideróforos y que, por consiguiente, inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* y *Y. pestis* cuando estos se crecen en condiciones de deficiencia de hierro. Debido a la carencia en humanos de enzimas homólogas a las inhibidas por este compuesto y al importante rol que los sistemas de adquisición de hierro juegan en la virulencia de estas bacterias, convierten a salicil-AMS en un importante compuesto para el desarrollo de un nuevo antimicrobiano para combatir tanto la tuberculosis como la peste.

7. REFERENCIAS

- Airas, R. K. (1996). "Differences in the magnesium dependences of the class I and class II aminoacyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli*." *Eur. J. Biochem.* **240**(1): 223-231.
- Airas, R. K. (2006). "Analysis of the kinetic mechanism of arginyl-tRNA synthetase." *Biochim. Biophys. Acta* **1764**(2): 307-319.
- Backus, E. J., Tresner, H. D., et al. (1957). "The nucleocidin and alazopeptin producing organisms: two new species of *Streptomyces*." *Antibiot. Chemotherapy* **7**: 532-541.
- Barclay, R. and Ratledge, C. (1988). "Mycobactins and exochelins of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and other related species." *J Gen Microbiol* **134**(3): 771-776.
- Bayazit, Y. A., Bayazit, N., et al. (2004). "Mycobacterial cervical lymphadenitis." *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* **66**(5): 275-280.
- Bearden, S. W., Fetherston, J. D., et al. (1997). "Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*." *Infect. Immun.* **65**(5): 1659-1668.
- Bearden, S. W. and Perry, R. D. (1999). "The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague." *Mol. Microbiol.* **32**(2): 403-414.
- Bearden, S. W., Staggs, T. M., et al. (1998). "An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11." *J. Bacteriol.* **180**(5): 1135-1147.
- Bibel, D. J. and Chen, T. H. (1976). "Diagnosis of plaque: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy." *Bacteriol. Rev.* **40**(3): 633-651.
- Buchrieser, C., Prentice, M., et al. (1998). "The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement." *J. Bacteriol.* **180**(9): 2321-2329.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., et al. (1999). "The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains." *Infect Immun* **67**(9): 4851-4861.
- Burrows, T. W. and Jackson, S. (1956). "The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin." *Br. J. Exp. Pathol.* **37**(6): 570-576.
- Burrows, T. W. and Jackson, S. (1956). "The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*." *Br. J. Exp. Pathol.* **37**(6): 577-583.
- Carniel, E. (1999). "The *Yersinia* high-pathogenicity island." *Int. Microbiol.* **2**(3): 161-167.
- Carniel, E., Guilvout, I., et al. (1996). "Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*." *J. Bacteriol.* **178**(23): 6743-6751.
- Carniel, E., Mazigh, D., et al. (1987). "Correlation between the presence of two high molecular weight iron-regulated proteins and the virulence of *Yersinia*." *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**: 259-265.
- Carniel, E., Mazigh, D., et al. (1987). "Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence." *Infect. Immun.* **55**(1): 277-280.
- Carniel, E., Mercereau-Puijalon, O., et al. (1989). "The gene coding for the 190,000-dalton iron-

- regulated protein of *Yersinia* species is present only in the highly pathogenic strains." *Infect. Immun.* **57**(4): 1211-1217.
- CDC. "<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>."
- Challis, G. L., Ravel, J., et al. (2000). "Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains." *Chem. Biol.* **7**(3): 211-224.
- Chambers, C. E., McIntyre, D. D., et al. (1996). "Physical and structural characterization of yersiniophore, a siderophore produced by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*." *Biometals* **9**(2): 157-167.
- Chipperfield, J. R. and Ratledge, C. (2000). "Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study." *Biometals* **13**(2): 165-168.
- Clem, A. and Galwankar, S. (2005). "Plague: a decade since the 1994 outbreaks in India." *J. Assoc. Physicians. India* **53**: 457-464.
- Cole, S. T., Eisenach, K. D., et al., Eds. (2005). *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Washington DC, ASM Press.
- Collins, H. L. (2003). "The role of iron in infections with intracellular bacteria." *Immunol. Lett.* **85**(2): 193-195.
- Conti, E., Franks, N. P., et al. (1996). "Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes." *Structure* **4**(3): 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., et al. (1997). "Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S." *Embo J.* **16**(14): 4174-4183.
- Copeland, R. (2000). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. New York, Wiley-VCH, Inc.
- Copeland, R. (2005). *Evaluation of Enzyme Inhibitors un Drug Discovery. A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, inc.
- Couch, R., O'Connor, S. E., et al. (2004). "Characterization of CmaA, an adenylation-thiolation didomain enzyme involved in the biosynthesis of coronatine." *J. Bacteriol.* **186**(1): 35-42.
- Cox, C. D. and Graham, R. (1979). "Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*." *J. Bacteriol.* **137**(1): 357-364.
- Crosa, J. H. and Walsh, C. T. (2002). "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(2): 223-249.
- Daniel, T. M. (2004). "The impact of tuberculosis on civilization." *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **18**(1): 157-165.
- Darwin, K. H., Ehrt, S., et al. (2003). "The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide." *Science* **302**(5652): 1963-1966.
- Das, P. (2003). "Infectious disease surveillance update." *Lancet Infect. Dis.* **3**(8): 462.
- de Almeida, A. M., Guiyoule, A., et al. (1993). "Chromosomal irp2 gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence." *Microb. Pathog.* **14**(1): 9-21.
- de Lorenzo, V., Wee, S., et al. (1987). "Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid

- ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor." J. Bacteriol. **169**(6): 2624-2630.
- De Voss, J. J., Rutter, K., et al. (1999). "Iron acquisition and metabolism by mycobacteria." J. Bacteriol. **181**(15): 4443-4451.
- De Voss, J. J., Rutter, K., et al. (2000). "The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(3): 1252-1257.
- Dennis, D., Gage, K., et al. (1999). Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. World Health Organization, Communicable Disease Surveillance and Response. WHO/CDS/CSR/EDC/99.2. Geneva, World Health Organization Report, Communicable Disease Surveillance and Response.
- Deodhar, N. S., Yemul, V. L., et al. (1998). "Plague that never was: a review of the alleged plague outbreaks in India in 1994." J. Public Health Policy **19**(2): 184-199.
- Department of Human Health and Services, C. (2005). Plague Fact Sheet: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/resources/plagueFactSheet.pdf>.
- Dhople, A. M., Ibanez, M. A., et al. (1996). "Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice." Microbios **87**(351): 77-87.
- Dietrich, J., Lundberg, C. V., et al. (2006). "TB vaccine strategies--what is needed to solve a complex problem?" Tuberculosis (Edinb) **86**(3-4): 163-168.
- Dolence, E. K., Minnick, A. A., et al. (1991). "Synthesis and siderophore and antibacterial activity of N5-acetyl-N5-hydroxy-L-ornithine-derived siderophore-beta-lactam conjugates: iron-transport-mediated drug delivery." J. Med. Chem. **34**(3): 968-978.
- Drechsel, H. and Jung, G. (1998). "Peptide siderophores." J. Pept. Sci. **4**(3): 147-181.
- Duplantier, J. M., Duchemin, J. B., et al. (2005). "From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence." Vet. Res. **36**(3): 437-453.
- Ell, S. R. (1984). "Immunity as a factor in the epidemiology of medieval plague." Rev. Infect. Dis. **6**(6): 866-879.
- Ell, S. R. (1985). "Iron in two seventeenth-century plague epidemics." J. Interdiscip. Hist. **15**(3): 445-457.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T., et al. (2002). "Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics." Biochemistry **41**(30): 9718-9726.
- Ferreras, J. A., Ryu, J. S., et al. (2005). "Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*." Nat Chem Biol **1**(1): 29-32.
- Fetherston, J. D. and Perry, R. D. (1994). "The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2." Mol. Microbiol. **13**(4): 697-708.
- Fetherston, J. D., Schuetze, P., et al. (1992). "Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element." Mol. Microbiol. **6**(18): 2693-2704.

- Finking, R., Neumuller, A., et al. (2003). "Aminoacyl adenylate substrate analogues for the inhibition of adenylation domains of nonribosomal peptide synthetases." *Chembiochem.* **4**(9): 903-906.
- Florini, J. R., Bird, H. H., et al. (1966). "Inhibition of protein synthesis in vitro and in vivo by nucleocidin, an antitrypanosomal antibiotic." *J. Biol. Chem.* **241**(5): 1091-1098.
- Francis, J., Madinaveitia, J., et al. (1949). "Isolation from acid-fast bacteria of a growth factor for *Mycobacterium Johnei* and a precursor of phthiocol." *Nature*: 163:365.
- Francis, J., Madinaveitia, J., et al. (1953). "Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium Johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium pheli*." *Biochem. J.* **55**: 596-607.
- Galimand, M., Guiyoule, A., et al. (1997). "Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid." *N Engl J Med* **337**(10): 677-680.
- Gehring, A. M., Bradley, K. A., et al. (1997). "Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate." *Biochemistry* **36**(28): 8495-8503.
- Gehring, A. M., DeMoll, E., et al. (1998). "Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*." *Chem. Biol.* **5**(10): 573-586.
- Gehring, A. M., Mori, I., et al. (1998). "The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*." *Biochemistry* **37**(33): 11637-11650.
- Ghosh, M. and Miller, M. J. (1995). "Design, synthesis, and biological evaluation of isocyanurate-based antifungal and macrolide antibiotic conjugates: iron transport-mediated drug delivery." *Bioorg. Med. Chem.* **3**(11): 1519-1525.
- Gong, S., Bearden, S. W., et al. (2001). "Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system." *Infect. Immun.* **69**(5): 2829-2837.
- Gorbach, S., Bartlett, J., et al., Eds. (2004). *Infectious Diseases*, Lipponcott Williams & Wilkins.
- Gordeuk, V. R., McLaren, C. E., et al. (1996). "Associations of iron overload in Africa with hepatocellular carcinoma and tuberculosis: Strachan's 1929 thesis revisited." *Blood* **87**(8): 3470-3476.
- Greenfield, R. A. and Bronze, M. S. (2003). "Prevention and treatment of bacterial diseases caused by bacterial bioterrorism threat agents." *Drug Discov. Today* **8**(19): 881-888.
- Greenfield, R. A., Drevets, D. A., et al. (2002). "Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism." *Am. J. Med. Sci.* **323**(6): 299-315.
- Griffiths, E. (1999). *Iron in biological systems. Iron and Infection.* J. Bullen and E. Griffiths, John Wiley & Sons Ltd.
- Guiyoule, A., Gerbaud, G., et al. (2001). "Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*." *Emerg. Infect. Dis.* **7**(1): 43-48.
- Haag, H., Hantke, K., et al. (1993). "Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*." *J. Gen. Microbiol.* **139**(9): 2159-2165.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J. Mol. Biol.* **166**(4): 557-580.

- Heesemann, J., Hantke, K., et al. (1993). "Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity." *Mol. Microbiol.* **8**(2): 397-408.
- Holmes, M. A., Paulsene, W., et al. (2005). "Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration." *Structure* **13**(1): 29-41.
- Hornung, J. M., Jones, H. A., et al. (1996). "The hmu locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem--protein complexes as iron sources." *Mol. Microbiol.* **20**(4): 725-739.
- Huelskamp, L., Anderson, S., et al. (2000). "TB of the spine: Pott's disease." *Orthop. Nurs.* **19**(4): 31-35.
- Hurdle, J. G., O'Neill, A. J., et al. (2005). "Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents." *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(12): 4821-4833.
- Idei, A., Kawai, E., et al. (1999). "Cloning and characterization of the *Pseudomonas fluorescens* ATP-binding cassette exporter, HasDEF, for the heme acquisition protein HasA." *J. Bacteriol.* **181**(24): 7545-7551.
- Imlay, J. A. and Linn, S. (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* **240**(4857): 1302-1309.
- Inglesby, T. V., Dennis, D. T., et al. (2000). "Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense." *Jama* **283**(17): 2281-2290.
- Iteman, I., Guiyoule, A., et al. (1993). "Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated *irp2* gene in *Yersinia pestis*: evidence for separate but related events." *Infect. Immun.* **61**(6): 2717-2722.
- Kasvosve, I., Gangaidzo, I. T., et al. (2000). "African iron overload." *Acta Clin. Belg.* **55**(2): 88-93.
- Katti, M. K. (2004). "Pathogenesis, diagnosis, treatment, and outcome aspects of cerebral tuberculosis." *Med. Sci. Monit.* **10**(9): RA215-229.
- Keating, T. A. and Walsh, C. T. (1999). "Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**(5): 598-606.
- Kim, S., Lee, S. W., et al. (2003). "Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**(4): 278-288.
- Kivanc-Altunay, I., Baysal, Z., et al. (2003). "Incidence of cutaneous tuberculosis in patients with organ tuberculosis." *Int. J. Dermatol.* **42**(3): 197-200.
- Kontoghiorghes, G. J. and Weinberg, E. D. (1995). "Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches." *Blood Rev.* **9**(1): 33-45.
- Krithika, R., Marathe, U., et al. (2006). "A genetic locus required for iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**(7): 2069-2074.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

- Lee, J., Kim, S. E., et al. (2003). "N-Alkoxysulfamide, N-hydroxysulfamide, and sulfamate analogues of methionyl and isoleucyl adenylates as inhibitors of methionyl-tRNA and isoleucyl-tRNA synthetases." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**(6): 1087-1092.
- Lemoine, F., Waller, J. P., et al. (1968). "Studies on methionyl transfer RNA synthetase. 1. Purification and some properties of methionyl transfer RNA synthetase from *Escherichia coli* K-12." *Eur. J. Biochem.* **4**(2): 213-221.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M., et al. (1994). "Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter." *J. Bacteriol.* **176**(17): 5372-5377.
- Letoffe, S., Redeker, V., et al. (1998). "Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore." *Mol. Microbiol.* **28**(6): 1223-1234.
- Lillard, J. W., Jr., Bearden, S. W., et al. (1999). "The haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is not essential for the pathogenesis of bubonic plague in mammals." *Microbiology* **145** (Pt 1): 197-209.
- Lounici, M., Lazri, M., et al. (2005). "[Plague in Algeria: about five strains of *Yersinia pestis* isolated during the outbreak of June 2003]." *Pathol. Biol. (Paris)* **53**(1): 15-18.
- Lounis, N., Truffot-Pernot, C., et al. (2001). "Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection." *J. Clin. Virol.* **20**(3): 123-126.
- Lucier, T. S. and Brubaker, R. R. (1992). "Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed-field gel electrophoresis." *J. Bacteriol.* **174**(7): 2078-2086.
- Lucier, T. S., Fetherston, J. D., et al. (1996). "Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis*." *Infect. Immun.* **64**(8): 3023-3031.
- Luo, M., Fadeev, E. A., et al. (2005). "Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages." *Nat. Chem. Biol.* **1**(3): 149-153.
- Marahiel, M. A. (1997). "Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics." *Chem. Biol.* **4**(8): 561-567.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., et al. (1997). "Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis." *Chem. Rev.* **97**(7): 2651-2674.
- May, J. J., Finking, R., et al. (2005). "Inhibition of the D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall." *Febs J* **272**(12): 2993-3003.
- May, J. J., Kessler, N., et al. (2002). "Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**(19): 12120-12125.
- Messenger, A. J. and Ratledge, C. (1982). "Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: Uptake of iron from ferric citrate." *J. Bacteriol.* **149**(1): 131-135.
- Meyer, D. (2006). "Iron chelation as therapy for HIV and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection under conditions of iron overload." *Curr. Pharm. Des.* **12**(16): 1943-1947.
- Miethke, M., Bissleret, P., et al. (2006). "Inhibition of aryl acid adenylation domains involved in bacterial siderophore synthesis." *Febs J.* **273**(2): 409-419.

- Miller, D. A., Luo, L., et al. (2002). "Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*." *Chem. Biol.* **9**(3): 333-344.
- Moalem, S., Percy, M. E., et al. (2002). "Epidemic pathogenic selection: an explanation for hereditary hemochromatosis?" *Med. Hypotheses* **59**(3): 325-329.
- Morton, G. O., Lancaster, J. E., et al. (1969). "The structure of nucleocidin. 3. (A new structure)." *J Am Chem Soc* **91**(6): 1535-1537.
- Mossessova, E. and Lima, C. D. (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." *Mol. Cell.* **5**(5): 865-876.
- Moyo, V. M., Gangaidzo, I. T., et al. (1997). "Tuberculosis and iron overload in Africa: a review." *Cent. Afr. J. Med.* **43**(11): 334-339.
- Nakano, M. M., Corbell, N., et al. (1992). "Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*." *Mol. Gen. Genet.* **232**(2): 313-321.
- Onwueme, K. C., Vos, C. J., et al. (2005). "The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria." *Prog. Lipid Res.* **44**(5): 259-302.
- Palma, M., Worgall, S., et al. (2003). "Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron." *Arch. Microbiol.* **180**(5): 374-379.
- Pelludat, C., Rakin, A., et al. (1998). "The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation." *J. Bacteriol.* **180**(3): 538-546.
- Pendrak, M. L. and Perry, R. D. (1991). "Characterization of a hemin-storage locus of *Yersinia pestis*." *Biol. Met.* **4**(1): 41-47.
- Perry, R. D., Balbo, P. B., et al. (1999). "Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation." *Microbiology* **145** (Pt 5): 1181-1190.
- Perry, R. D. and Fetherston, J. D. (1997). "*Yersinia pestis*: etiologic agent of plague." *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(1): 35-66.
- Perry, R. D., Pendrak, M. L., et al. (1990). "Identification and cloning of a hemin storage locus involved in the pigmentation phenotype of *Yersinia pestis*." *J. Bacteriol.* **172**(10): 5929-5937.
- Peterson, E. M., Brownell, J., et al. (1992). "Synthesis and biological evaluation of 5'-sulfamoylated purinyl carbocyclic nucleosides." *J. Med. Chem.* **35**(22): 3991-4000.
- Pfeifer, B. A., Wang, C. C., et al. (2003). "Biosynthesis of Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using *Escherichia coli* as a heterologous host." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6698-6702.
- Quadri, L. E. (2000). "Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases." *Mol. Microbiol.* **37**(1): 1-12.
- Quadri, L. E., Keating, T. A., et al. (1999). "Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF." *Biochemistry* **38**(45):

14941-14954.

- Quadri, L. E., Sello, J., et al. (1998). "Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin." *Chem. Biol.* **5**(11): 631-645.
- Quadri, L. E., Weinreb, P. H., et al. (1998). "Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases." *Biochemistry* **37**(6): 1585-1595.
- Ramalingaswami, V. (2001). "Psychosocial effects of the 1994 plague outbreak in Surat, India." *Mil. Med.* **166**(12 Suppl): 29-30.
- Ratlidge, C., Patel, P. V., et al. (1982). "Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: the location of mycobactin by electron microscopy." *J. Gen. Microbiol.* **128**(7): 1559-1565.
- Rausch, C., Weber, T., et al. (2005). "Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs)." *Nucleic Acids Res.* **33**(18): 5799-5808.
- Reichman, L. and Hershfield, E., Eds. (2000). *Tuberculosis: A comprehensive international Approach. Lung Biology in Health and Disease.* New York, Marcel Dekker, Inc.
- Reid, A., Scano, F., et al. (2006). "Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration." *Lancet Infect. Dis.* **6**(8): 483-495.
- Resch, S. C., Salomon, J. A., et al. (2006). "Cost-Effectiveness of Treating Multidrug-Resistant Tuberculosis." *PLoS Med* **3**(7): e241.
- Rodriguez, G. M. and Smith, I. (2003). "Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence." *Mol Microbiol* **47**(6): 1485-1494.
- Roosenberg, J. M., 2nd, Lin, Y. M., et al. (2000). "Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents." *Curr. Med. Chem.* **7**(2): 159-197.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., et al. (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." *Gene* **56**(1): 125-135.
- Rossi, M. S., Fetherston, J. D., et al. (2001). "Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*." *Infect. Immun.* **69**(11): 6707-6717.
- Rusnak, F., Faraci, W. S., et al. (1989). "Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product." *Biochemistry* **28**(17): 6827-6835.
- Ryan, K. and Ray, G., Eds. (2003). *Medical Microbiology. An introduction to infectious diseases,* McGraw-Hill.
- Ryll, R., Kumazawa, Y., et al. (2001). "Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review." *Microbiol. Immunol.* **45**(12): 801-811.
- Ryll, R., Watanabe, K., et al. (2001). "Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages." *Microbes*

- Infect. **3**(8): 611-619.
- Sambrook, J., Fritsch, E., et al. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaible, U. E., Collins, H. L., et al. (2002). "Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis." *J. Exp. Med.* **196**(11): 1507-1513.
- Schaible, U. E. and Kaufmann, S. H. (2004). "Iron and microbial infection." *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(12): 946-953.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987). "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores." *Anal Biochem.* **160**(1): 47-56.
- Scott, S. and Duncan, C. (2001). *Biology of Plagues: evidence from Historical Populations*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sharma, M. P. and Bhatia, V. (2004). "Abdominal tuberculosis." *Indian J. Med. Res.* **120**(4): 305-315.
- Shivaji, S., Bhanu, N. V., et al. (2000). "Identification of *Yersinia pestis* as the causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting." *FEMS Microbiol. Lett.* **189**(2): 247-252.
- Snow, G. A. (1965). "Isolation and Structure of Mycobactin T, a Growth Factor from *Mycobacterium tuberculosis*." *Biochem. J.* **97**: 166-175.
- Snow, G. A. (1965). "The Structure of Mycobactin P, a Growth Factor for *Mycobacterium johnei*, and the Significance of its Iron Complex." *Biochem. J.* **94**: 160-165.
- Snow, G. A. (1970). "Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors from Mycobacteria." *Bacteriological reviews* **34**(2): 99-125.
- Sokol, P. A. (1986). "Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*." *J. Clin. Microbiol.* **23**(3): 560-562.
- Somu, R. V., Boshoff, H., et al. (2006). "Rationally designed nucleoside antibiotics that inhibit siderophore biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis*." *J. Med. Chem.* **49**(1): 31-34.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., et al. (1999). "The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases." *Chem. Biol.* **6**(8): 493-505.
- Staggs, T. M. and Perry, R. D. (1991). "Identification and cloning of a fur regulatory gene in *Yersinia pestis*." *J. Bacteriol.* **173**(2): 417-425.
- Stintzi, A., Barnes, C., et al. (2000). "Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**(20): 10691-10696.
- Story, A., van Hest, R., et al. (2006). "Tuberculosis and social exclusion." *Bmj* **333**(7558): 57-58.
- Suo, Z., Walsh, C. T., et al. (1999). "Tandem heterocyclization activity of the multidomain 230 kDa HMWP2 subunit of *Yersinia pestis* yersiniabactin synthetase: interaction of the 1-1382 and 1383-2035 fragments." *Biochemistry* **38**(42): 14023-14035.
- Surgalla, M. J. and Beesley, E. D. (1969). "Congo red-agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*." *Appl. Microbiol.* **18**(5): 834-837.
- Thompson, J. M., Jones, H. A., et al. (1999). "Molecular characterization of the hemin uptake

- locus (hmu) from *Yersinia pestis* and analysis of hmu mutants for hemin and hemoprotein utilization." *Infect. Immun.* **67**(8): 3879-3892.
- Trousseau, A. (1872). Lecture LXXXVII: true and false chlorosis. London, UK.
- Wake, A., Misawa, M., et al. (1975). "Siderochrome production by *Yersinia pestis* and its relation to virulence." *Infect. Immun.* **12**(5): 1211-1213.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P. (2004). "Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores." *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 611-647.
- WHO (1993). "Tuberculosis: a global emergency." *World Health Forum* **14**(4): 438.
- WHO (1996). The World Health Report 1996: Fighting Disease, Fostering Development. Geneva.
- WHO (1997). "Human plague in 1995." *Wkly. Epidemiol. Rec.* **72**(46): 344-347.
- WHO (2004). "Human plague in 2002 and 2003." *Wkly. Epidemiol. Rec.* **79**(33): 301-306.
- WHO (2004). *Wkly. Epidemiol. Rec.* **33**(79): 301-308.
- WHO (2005). Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. (WHO/HTM/TB/2005.349). W. R. 2005.
- WHO (2006). "International meeting on preventing and controlling plague: the old calamity still has a future." *Wkly. Epidemiol. Rec.* **81**(28): 278-284.
- Wise, G. J. and Marella, V. K. (2003). "Genitourinary manifestations of tuberculosis." *Urol. Clin. North Am.* **30**(1): 111-121.
- Zink, A. R., Grabner, W., et al. (2005). "Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis." *Am. J. Phys. Anthropol.* **126**(1): 32-47.

8. ANEXO

8.1 Trabajos publicados

El trabajo desarrollado en esta tesis generó la publicación que se adjunta a continuación:

Ferreras JA, Ryu JS, Di Lello F, Tan DS, Quadri LE.

Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*.

Nature Chemical Biology. 2005. 1(1): 29-32.